

616
Б-638

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Под редакцией
Е.С.Северина

Учебная
литература
для студентов
медицинских
вузов

Учебная литература
для студентов медицинских вузов

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Под редакцией
члена-корреспондента РАН
Е.С.Северина

Допущен Департаментом
научно-исследовательских
и образовательных медицинских учреждений
Министерства здравоохранения
Российской Федерации в качестве учебного
пособия для студентов медицинских вузов



Москва
"Медицина"
2000

Абонемент
научной литературы

БИБЛИОТЕКА
НИЖЕГОРОДСКОЙ
ГОСУДАРСТВЕННОЙ
МЕДИЦИНСКОЙ
АКАДЕМИИ

Федеральная программа книгоиздания России

Рецензенты: **А.П.Шепелев**, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой общей и клинической биохимии № 1 Ростовского государственного медицинского университета; **Л.М.Пустовалова**, кандидат медицинских наук, доцент, зав. кафедрой общей и клинической биохимии № 2 Ростовского государственного медицинского университета.

Биохимические основы патологических процессов:
Б63 Учеб. пособие/Под ред. Е.С.Северина. — М.: Медицина, 2000. — 304 с.: ил. ISBN 5-225-04187-6

В пособии изложены современные представления о биохимических нарушениях при ряде патологических состояний и болезней. Рассмотрены биохимические механизмы патологии обмена углеводов, липидов, азотистого обмена, молекулярные основы онкогенеза и действия оксида азота. Отдельные главы посвящены инсулинзависимому сахарному диабету и алкоголизму.

Для студентов медицинских вузов, аспирантов.

ISBN 5-225-04187-6

ББК 52.5

© Издательство «Медицина», Москва, 2000

Все права авторов защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

- | | |
|---|---|
| Авдеева Людмила Викторовна | — кандидат биологических наук, доцент |
| Алейникова Татьяна Леонидовна | — кандидат биологических наук, доцент |
| Белушкина Наталья Николаевна | — кандидат биологических наук |
| Волкова Наталья Петровна | — кандидат биологических наук, доцент |
| Воспельникова Наталья Дмитриевна | — кандидат биологических наук, доцент |
| Губарева Александра Евгеньевна | — кандидат биологических наук, доцент |
| Зезеров Евгений Гаврилович | — доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАЕН |
| Лихачева Нина Викторовна | — кандидат биологических наук, доцент |
| Москалева Елизавета Юрьевна | — доктор биологических наук |
| Николаев Александр Яковлевич | — доктор биологических наук, профессор |
| Осипов Евгений Валерьевич | — кандидат биологических наук, доцент |
| Северин Сергей Евгеньевич | — доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАЕН |
| Силаева Светлана Алексеевна | — доктор биологических наук, профессор |

Биохимия — одна из фундаментальных биологических дисциплин. Новейшие достижения в биохимии создали необходимые предпосылки для успеха в смежных областях и в первую очередь в медицине. В этой связи в последние годы неизмеримо возросло значение патологической биохимии как отрасли науки, изучающей молекулярные основы различных форм болезней.

Книга представляет собой информативное и наглядное руководство, знакомящее читателей с биохимическими аспектами некоторых патологических состояний. Она предназначена в первую очередь студентам-медикам, поскольку врач будущего должен представлять основные метаболические процессы, лежащие в основе жизнедеятельности, и причины их нарушений при болезнях. Поэтому очень современно звучат слова, написанные в 1895 г. Уильямом Ослером о том, что «без физиологии и химии врач будет бесцельно барахтаться на одном месте и никогда не сможет создать сколько-нибудь правильную концепцию болезни». В то же время книга может быть полезна врачам, аспирантам, биохимикам, биологам различных специальностей, всем тем, кто интересуется молекулярными причинами наиболее распространенных патологий.

К настоящему времени показано, что большинство заболеваний связано с поломками в ДНК, приводящими к нарушениям функционирования метаболических путей. К сожалению, при постановке диагноза и проведении терапевтических мероприятий врачи не всегда уделяют должное внимание основным причинам, лежащим в основе возникновения болезни. Это происходит, по-видимому, вследствие недостаточной связи в изучении биохимии и последующих клинических дисциплин. Задачей данного учебного пособия является восполнение этого пробела.

В книге изложены современные представления о биохимических нарушениях при ряде патологических состояний и болезней.

Большое внимание уделено нарушениям метаболизма липидов, аминокислот, углеводов. Описаны биохимические из-

менения, которые характеризуют наследственные болезни. Отдельная глава посвящена одному из современных и перспективных направлений молекулярной биологии — апоптозу. Читатели узнают, что в основе большинства молекулярных заболеваний лежат механизмы нарушения регуляции программированной гибели клетки. Пособие содержит также главу, посвященную молекулярным основам онкогенеза. В ней приведены сведения об онкогенезе и генах-супрессорах опухолей; объясняются причины, приводящие к утрате механизмов контроля роста в опухолевых клетках, а также причины приобретения этими клетками способности к инвазии и метастазированию. Освещены основные подходы к диагностике и лечению этой группы болезней, перспективные направления их совершенствования. Использование знаний современной патобиохимии не только позволит врачам установить причинно-следственные связи в возникновении тех или иных заболеваний, но вооружит их знаниями для совершенствования методов лабораторной диагностики и оценки эффективности терапевтических мероприятий. Именно этим объясняется тот большой интерес, который проявляют врачи всех специальностей к основам патологической биохимии.

Книга дает представление о современном состоянии патобиохимии и позволяет оценить проблемы, которые еще предстоит решить, а также увидеть перспективы этого решения. Пособие отражает современные достижения науки в каждом из разделов. Книга иллюстрирована большим числом рисунков, схем, таблиц, содержит задачи для самоконтроля. Все это способствует более полному усвоению представленного материала и может быть использовано в преподавании клинической биохимии и других дисциплин в медицинских вузах.

Член-корр. РАН, профессор *Е. С. Северин*

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ag	— антиген
АДГ	— алкогольдегидраза
АКТГ	— адренокортикотропный гормон
АлАТ	— аланинаминотрансфераза
Апо	— апопротеин
АУ	— ароматические углеводороды
АФК	— активные формы кислорода
АФП	— α -фетопроtein
Ац	— ацетальдегид
АЦаза	— аденилатциклаза
АцДГ	— ацетальдегидрогеназа
ВИЧ	— вирус иммунодефицита человека
ГАЛТ	— галактозо-1-фосфатуридилтрансфераза
ГК	— глюкокортизон
ГлДГ	— глутаматдегидрогеназа
Гликогентаза-Р	— гликогенсинтаза фосфорилированная
ГЭБ	— гематоэнцефалический барьер
ДАГ	— диацилглицерин
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
Е	— единица активности фермента
ИЛ	— интерлейкин
ИФ	— интерферон
ИФ ₃	— инозитол-три-фосфат
Киназа фосфорилазы-Р	— киназа фосфорилазы фосфорилированная
КК	— креатинкиназа
ЛАП	— лейцинаминопептидаза
ЛВП	— липопротеины высокой плотности
ЛДГ	— лактатдегидрогеназа
ЛНП	— липопротеины низкой плотности
ЛОНП	— липопротеины очень низкой плотности
ЛП	— липопротеины
ЛПП	— липопротеины промежуточной плотности
ЛХАТ	— лецитинхолестеролацилтрансфераза
Мол. масса	— молекулярная масса
ОМ	— опухолевые маркеры
ПОЛ	— перекисное окисление липидов
РНК	— рибонуклеиновая кислота
СДГ	— сукцинатдегидрогеназа
ТАГ	— триацилглицерины
тир-PPR	— тирозиновая протеинкиназа
ТФР	— трансформирующий фактор роста
ФНО	— фактор некроза опухоли
ФР	— фактор роста

ФРТ	— фактор роста тромбоцитов
ХС	— холестерин
ЩФ	— щелочная фосфатаза
ЦХ	— цитохром
ADP	— аденозиндифосфат
AMP	— аденозинмонофосфат
ATP	— аденозинтрифосфат
Bcl	— проапоптотический белок
Bax	— антиапоптотический белок
BH ₂	— дигидриобиптерин
BH ₁	— тетрагидриобиптерин
CaM	— кальмодулин
CoA	— коэнзим А
GDP	— гуанозиндифосфат
GGPPT	— гуанилин-гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза
GMP	— гуанозинмонофосфат
GTP	— гуанозинтрифосфат
MHC	— комплекс гистосовместимости
NAD	— никотинамидадениндинуклеотид
NADP ⁺	— никотинамидадениндинуклеотидфосфат, окисленная форма
NADPH	— никотинамидадениндинуклеотидфосфат, восстановленная форма
NK	— природные (естественные) клетки-киллеры
NO	— оксид азота
NOS	— NO-синтаза
eNOS	— эндотелиальная форма NOS
iNOS	— индуцибельная форма NOS
nNOS	— нейрональная форма NOS
O ₂ ⁻	— супероксидный анион-радикал
P	— фосфатный остаток
P _i	— неорганический фосфат
PP _i	— неорганический пирофосфат
UDP	— уридиндифосфат
UTP	— уридинтрифосфат

Изучение последовательности химических реакций в живом организме — от введения исходных веществ (пища) до появления конечных продуктов (новые ткани, энергия, продукты выделения) — является предметом биохимии. В настоящее время изучены последовательности реакций большинства метаболических путей в живой клетке.

Основные пути химических превращений одинаковы для большого разнообразия живой материи, несмотря на количественные и качественные различия между отдельными организмами и клетками.

Сходство метаболических путей во всех живых организмах состоит в том, что почти каждая реакция является катализируемым процессом и катализаторы (ферменты) представляют собой группу специфических белков, обладающих некоторыми общими свойствами.

История энзимологии началась с представлений о характере спиртового брожения дрожжевых клеток и пищеварения у высших животных. Далее переваривание изучали *in vitro* при нагревании пищи в образцах желудочного сока и *in vivo* с помощью желудочных фистул (например, при пулевом ранении) у человека и животных.

В 1836 г. был открыт пепсин, затем остальные протеолитические ферменты, амилазы и липазы. Изучению пищеварения способствовала внеклеточная локализация этого процесса.

Начало исследований внутриклеточных ферментов связано с выделением Buchner в 1896 г. бесклеточного дрожжевого экстракта, который сохранял способность сбраживать глюкозу в спирт. Фракционирование дрожжевого экстракта на компоненты — ферменты и промежуточные метаболиты заняло следующие 30 лет.

К 50-м годам XX столетия были изучены основные процессы и многие детали метаболизма в организме человека. Доказано, что объяснение как универсальных, так и уникальных проявлений жизни следует искать в координировании химических процессов и свойствах ферментов, катализирующих их.

Большие достижения в области химии и биохимии ферментов, развитие методов их выделения и очистки, разработка простых способов определения их активности позволили использовать ферменты в клинической практике.

В настоящее время клиническая энзимология развивается по трем направлениям: энзимодиагностика, энзимотерапия и использование регуляторов активности ферментов как лекарственных препаратов.

1.1. СТРОЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ В КЛЕТКАХ И ТКАНЯХ

К настоящему времени известно более 1000 ферментов, из которых более 150 выделены в виде гомогенных препаратов.

Ферменты являются белками. Большинство из них имеет молекулярную массу (молекулярная масса) более 10 000. Активный центр ферментов — участок связывания с субстратом — образуется радикалами аминокислотных остатков пептидной цепи при формировании третичной структуры. Уникальное строение активного центра обеспечивает высокую специфичность ферментативного катализа. Для проявления активности многим ферментам, кроме белковой части (апофермент), необходим небелковый компонент — кофермент, который может быть связан с апоферментом ковалентными или нековалентными связями. В состав многих коферментов входят витамины.

Некоторые ферменты, проферменты и их субстраты в норме постоянно циркулируют в крови человека и выполняют физиологические функции — это *функциональные ферменты плазмы*. К ним относятся, например, липопротеинлипаза, псевдохолинэстераза, проферменты компонентов свертывающей и противосвертывающей систем крови. Они синтезируются в печени, их концентрация в крови такая же, как в тканях, или более высокая. *Нефункциональные ферменты плазмы* известных физиологических функций в крови не выполняют, их субстраты в плазме не обнаруживаются. Активность нефункциональных ферментов в норме в крови очень мала. Это прежде всего ферменты, выделяемые эндокринными железами: панкреатические амилаза и липаза, щелочная фосфатаза (из желчи), кислая фосфатаза (из предстательной железы). Причинами появления нефункциональных ферментов в плазме крови являются нормальные процессы разрушения клеток (эритроцитов, лейкоцитов и др.) и удаление ферментов из внеклеточной жидкости путем инактивации и деградации или экскреции.

1.1.1. СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Внутри клеток разных тканей и в самой клетке ферменты распределены неодинаково. Первым упоминанием об этом

Таблица 1.1

Локализация некоторых ферментов внутри клетки

Цитозоль	Митохондрии	Лизосомы	Микросомы	Ядро	Клеточная мембрана
Амилаза Липаза панкреатическая Глицеро-3-фосфатдегидрогеназа Гистидиназа Сорбитолдегидрогеназа Лактатдегидрогеназа Алкогольдегидрогеназа Креатинкиназа Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа Аланинаминотрансфераза Аспаргатаминотрансфераза Гликогенсинтаза	Пируватдегидрогеназный комплекс Цитратсинтаза Малатдегидрогеназа Уроканиназа Глутаматдегидрогеназа Креатинкиназа Ацил-CoA-дегидрогеназа δ-Аминолевулинатсинтаза Аспаргатаминотрансфераза Пируваткиназа	Кислая фосфатаза α-Галактозидаза β-Галактозидаза Гиалуронидаза Коллагеназа β-Глюкуронидаза Арилсульфатаза Кислая рибонуклеаза Кислая дезоксирибонуклеаза Катепсин α-Маннозидаза	Глюкозо-6-фосфатаза γ-Глутамилтранспептидаза Моноаминоксидаза Церулоплазмин Глюкуронидтрансфераза	ДНК-полимераза ДНК-лигаза Топоизомераза Эндонуклеаза РНК-полимераза Хеликаза NAD-синтаза	5'-Нуклеотидаза Щелочная фосфатаза γ-Глутамилтранспептидаза K ⁺ , Na ⁺ -АТРаза Аденилатциклаза

можно считать 1913 г., когда Warburg определил, что процесс клеточного дыхания связан с осаждаемыми внутриклеточными частицами. Развитие метода дифференциального ультрацентрифугирования ускорило изучение внутриклеточной локализации ферментов. Биохимический анализ отдельных клеточных фракций показал, что ферменты расположены в различных органеллах соответственно их функции в обмене веществ (табл. 1.1).

В цитозоле (растворимая фракция) содержатся ферменты гликолиза, пентозофосфатного пути распада глюкозы, активации аминокислот, синтеза и распада гликогена, ферментный комплекс — синтаза жирных кислот и многие другие.

В митохондриях происходит большинство обменных процессов, которые обеспечивают энергией всю клетку. В них локализованы ферменты цикла Кребса, окислительного фосфорилирования, окисления жирных кислот, глутаматдегидрогеназа, синтаза δ-аминолевулиновой кислоты и др.

Лизосомы участвуют в процессах внутриклеточного переваривания. Содержат около 30 ферментов, главным образом гидролазы: рибонуклеазу, эстеразы, протеазы, β-глюкуронидазу и др. Лизосомальные ферменты представляют интерес для медицины вследствие их участия в воспалительных процессах, повреждениях клеток, рассасывании ткани и некоторых наследственных метаболических заболеваниях.

Микросомальная фракция включает рибосомы и эндоплазматический ретикулум. В ней содержатся ферменты синтеза белков, холинэстераза, церулоплазмин, глюкозо-6-фосфатаза, γ-глутамилтранспептидаза, ферменты конъюгации и др.

В ядре предположительно около 40 ферментов, в число которых входят репликативный комплекс, РНК-полимераза и, по-видимому, НАД-синтаза.

Клеточная (плазматическая) мембрана содержит ферменты транспорта веществ — транслоказы, аденилатциклазу, 5-нуклеотидазу и некоторые другие.

Активность ряда ферментов обнаруживается одновременно в нескольких органеллах.

1.1.2. ОРГАННАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ В РАСПРЕДЕЛЕНИИ ФЕРМЕНТОВ

Дифференцировка клеток на органы и ткани сопровождается биохимическими изменениями в них. В результате таких изменений каждый орган и ткань имеют специфичный белковый (в том числе ферментный) состав. Многие ферменты широко распространены в разных тканях, но в различных коли-

чествах, другие активны в одном или нескольких органах и фактически отсутствуют во всех других.

Известно всего два фермента, которые находятся только в одном органе — в печени — это орнитинкарбамоилтрансфераза (КФ 2.1.3.3) и уроганиаза (КФ 4.2.1.49). Для двух органов специфичны гистидаза (КФ 4.3.1.3) — в печени и эпидермисе, трансамидиназа (КФ 2.1.4.1) — в почках и поджелудочной железе, креатинкиназа (КФ 2.7.3.2) — в сердечной и скелетной мышцах, гуанидинацетат-метилтрансфераза (КФ 2.1.1.2) — в печени и поджелудочной железе. Кислая фосфатаза (КФ 3.1.3.2) очень активна в предстательной железе и малоактивна (до 10 % от максимума) в других органах.

1.2. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА УРОВЕНЬ ФЕРМЕНТОВ ВО ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ЖИДКОСТИ

Как было отмечено выше, активность нефункциональных ферментов плазмы крови в норме небольшая. Однако количество таких ферментов значительно увеличивается при повреждении мембран клеток, их усиленной пролиферации или гибели (рис. 1.1).

Многие факторы способны повышать проницаемость мембран и таким образом вызывать появление внутриклеточных ферментов в плазме. К таким факторам относятся недостаток притока кислорода в клетку, снижение концентрации глюкозы в крови, присутствие многих лекарственных и химических веществ, блокирующих гликолиз, работу ЦТК и окислительное фосфорилирование. Патогенные бактерии, бактериальные токсины и вирусы воздействуют непосредственно на мембрану. Кроме того, существуют генетически обусловленные нарушения структуры мембран. Утечка ферментов, т.е. выход внутриклеточных ферментов в кровь, может быть обратимой или прогрессировать до необратимой стадии.

При выделении ферментов скорость их появления в крови зависит от трех факторов. Прежде всего от градиента концентрации, обеспечивающего движение ферментов через мембрану. Величина его различна для разных ферментов и типов тканей. Например, активность лактатдегидрогеназы в клетках печени примерно в 3000 раз, в эритроцитах — в 200 раз выше, алкогольдегидрогеназы — в 20 000, аспартат- и аланинаминотрансферазы — в 10 000 раз выше, чем в плазме крови. Чем выше градиент, тем быстрее фермент появляется в крови. Второй фактор — размер молекул фермента. Более мелкие молекулы диффундируют с большей скоростью, чем крупные, и выделяются на ранней стадии повреждения мембраны. Третий



Рис. 1.1. Факторы, влияющие на активность ферментов в плазме крови [Мосс Д.В. и др., 1978].

фактор — внутриклеточная локализация ферментов. В первую очередь в плазму выходят цитоплазматические ферменты, а при некрозе клетки, когда разрушаются внутриклеточные органеллы, — и митохондриальные. Примером может служить увеличение в крови активности аспартатаминотрансферазы. И цитоплазматическая, и митохондриальная форма фермента имеет одинаковую молекулярную массу, а митохондриальная выходит в кровь значительно медленнее.

Присутствие во внеклеточной жидкости веществ, изменяющих активность ферментов (активаторов или ингибиторов), также влияет на активность ферментов в крови. Наиболее важными, с диагностической точки зрения, являются те изменения, которые возникают в результате нарушения скорости образования специфических ферментов вследствие либо повышения их синтеза клетками, либо увеличения количества таких клеток. Имеет значение также увеличение количества ферментов в крови, связанное с выделением их из поврежденных или мертвых клеток.

1.3. ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

1.3.1. ЭНЗИМОДИАГНОСТИКА

1.3.1.1. Принцип диагностики заболеваний по активности ферментов в биологических жидкостях

Энзимодиагностика основана на учете следующих факторов:

- наличие органоспецифических ферментов;
- активность органоспецифических ферментов в крови или моче в норме отсутствует или очень мала;
- при повреждении клеток соответствующего органа активность ферментов в крови или моче резко повышается.

В настоящее время известно более 30 ферментов, активность которых в крови увеличивается при повреждении клеток различных органов в период острого или хронического заболевания. Определение активности большинства из этих ферментов в сыворотке крови используется для диагностики многих заболеваний и контроля за лечением (табл. 1.2).

Таблица 1.2

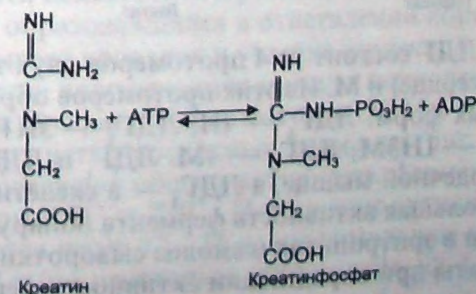
Некоторые ферменты, используемые в клинике для диагностики

Фермент	Локализация в клетке	Заболевания, при которых фермент наиболее активен в крови
Аланинаминотрансфераза	Цитозоль	Гепатиты, цирроз, инфаркт миокарда
Аспартатаминотрансфераза	Цитозоль, митохондрии	Инфаркт и другие заболевания сердца, гепатиты, заболевания почек
Амилаза	Цитозоль	Острый панкреатит
Креатинкиназа (изоферменты)	Цитозоль, митохондрии	Инфаркт миокарда, заболевания скелетных мышц
Лактатдегидрогеназа (изоферменты)	Цитозоль	Инфаркт миокарда, гепатиты, рак печени
γ-Глутамилтранспептидаза	Цитоплазматическая мембрана	Гепатиты, цирроз, алкогольное поражение печени
Липаза панкреатическая	Цитозоль	Острый панкреатит, рак поджелудочной железы

Продолжение

Фермент	Локализация в клетке	Заболевания, при которых фермент наиболее активен в крови
Кислая фосфатаза (pH 4,9) (изоферменты)	Лизосомы	Метастазирующая карцинома предстательной железы, аденома предстательной железы
Щелочная фосфатаза (pH 10,0) (изоферменты)	Плазматическая мембрана	Заболевания костей, цирроз и новообразования печени, закупорка протоков печени
Глутаматдегидрогеназа	Митохондрии	Острые гепатиты (некротические формы), печеночная кома
Лейцинаминопептидаза	Цитозоль	Цирроз, гепатит, рак поджелудочной железы
5'-Нуклеотидаза	Плазматическая мембрана	Механическая желтуха, цирроз, метастазы в печени
Сорбитолдегидрогеназа	Цитозоль	Гепатиты, желтухи
Псевдохолинэстераза	Цитозоль	Нефроз, сахарный диабет II типа, алкоголизм
Гистидаза	Цитозоль	Поражения печени

Ряд ферментов имеет изоферментные формы. Изоферменты — это белки, катализирующие одну и ту же реакцию, но различающиеся по своим физико-химическим свойствам. Как правило, это олигомерные белки, образованные разными протомерами. Часто определенная ткань синтезирует преимущественно один из протомеров. Активный олигомерный фермент может быть построен из таких протомеров в различных комбинациях, в результате чего образуются изоферменты. Примером могут служить некоторые ферменты, широко используемые в клиниках для диагностики заболеваний: креатинкиназа (КК) катализирует реакцию образования креатинфосфата.



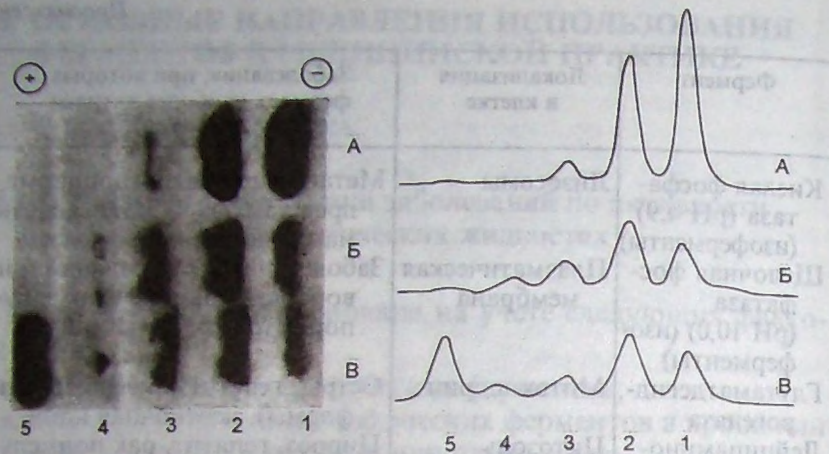
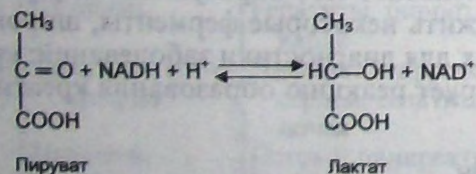


Рис. 1.2. Электрофореграмма изоферментов ЛДГ в сыворотке крови здорового человека (Б), с инфарктом миокарда (А) и гепатитом (В). Справа представлено относительное содержание изоферментов (фотометрическое сканирование пятен) [Мари Р., 1993].

Креатинкиназа является димером, содержащим два вида субъединиц: М (от англ. muscle — мышца) и В (от англ. brain — мозг). Из них образуется три изофермента: ВВ преобладает в мозге, МВ — в сердечной мышце и ММ — в скелетных мышцах. В норме активность креатинкиназы в сыворотке крови равна (ориентировочно) у женщин 40—285, у мужчин — 55—370 Е/л, причем активность изофермента ММ составляет 98 %, МВ — 2 % от общей, а ВВ отсутствует. Повышается активность креатинкиназы в крови при инфаркте миокарда, миодистрофии, травмах головы, острой лучевой болезни и некоторых других.

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) (КФ 1.1.1.27) катализирует реакцию.



Молекула ЛДГ состоит из 4 протомеров двух типов: Н (от англ. heart — сердце) и М. Из этих протомеров образуется пять изоферментных форм: ЛДГ₁ — 4Н, ЛДГ₂ — 3Н1М, ЛДГ₃ — 2Н2М, ЛДГ₄ — 1Н3М, ЛДГ₅ — 4М. ЛДГ₁ и ЛДГ₂ наиболее активны в сердечной мышце, а ЛДГ₃ — в скелетных мышцах и печени. Небольшая активность фермента обнаруживается во всех органах и в эритроцитах (гемолиз сыворотки резко завышает результаты при определении активности фермента в сы-



Рис. 1.3. Изменение активности некоторых ферментов при инфаркте миокарда.

воротке крови). В норме активность ЛДГ в крови равна 170—520 Е/л. Повышение активности наблюдается при инфаркте миокарда, гепатитах, раке печени, гемолитической анемии, атрофии мышц и др. (рис. 1.2).

Щелочная фосфатаза (ЩФ) (КФ 3.1.3.1) имеет 11 изоферментных форм: печеночные I и II, костная, кишечная, плацентарная, желчная и неидентифицированные.

Многие из приведенных в табл. 1.2 ферментов не являются строго специфичными для указанных заболеваний. Часто для диагностики определяют не один, а несколько ферментов.

1.3.1.2. Диагностика заболеваний

Диагностика болезней миокарда. Стенокардия напряжения стабильного течения, нестабильное течение стенокардии и острый инфаркт миокарда (ОИМ) — различные формы ишемической болезни сердца (ИБС). Атеросклероз коронарных артерий является почти обязательным условием возникновения ОИМ.

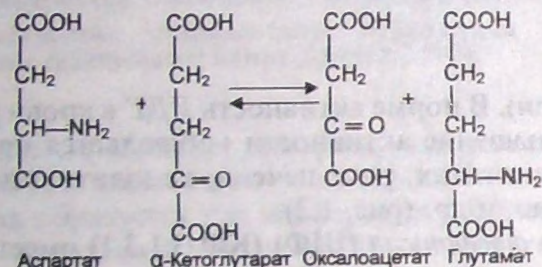
Сгусток, образовавшийся в ответвлении коронарной артерии, перекрывает кровоток в участке сердечной мышцы. В результате клетки повреждаются и могут полностью отмереть и разрушиться. Для ранней диагностики ОИМ в сыворотке крови определяют четыре основных фермента (рис. 1.3).

ЛДГ. Определяют общую активность фермента и изоферментных форм ЛДГ₁ и ЛДГ₂. Повышение активности фермента наблюдается через 12—24 ч, максимальная активность — через 48—72 ч (по некоторым источникам, на 4-е сутки). По-

вышенная активность сохраняется до 10 сут. Активность ЛДГ коррелирует с размерами повреждения миокарда.

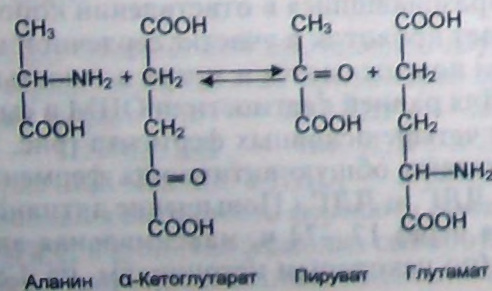
КК. Определяют общую активность фермента и активность изофермента МВ. Общая активность повышается через 4—6 ч и достигает максимума через 18—30 ч, а максимальная активность изофермента МВ наблюдается спустя 12—24 ч. Примерно через 72 ч активность КК снижается до нормальной. Более длительное сохранение повышенной активности является плохим прогнозом. В подобных случаях инфаркт часто заканчивается летальным исходом. КК выходит в кровь быстрее других ферментов. При некрозе клеток активность фермента резко увеличивается.

Аминотрансферазы. Аспаратаминотрансфераза (АсАТ; КФ 2.6.1.1) катализирует реакцию трансаминирования между аспаратом и α -кетоглутаратом:



В норме в крови активность АсАТ составляет 5—40 Е/л. Повышение активности указывает скорее на повреждение клеток, чем на нарушение функции органа. При ОИМ активность фермента в крови увеличивается через 4—6 ч, а максимум наблюдается через 40—70 ч. Повышенная активность сохраняется 3—5 сут. Наиболее резкое повышение активности происходит при некрозе ткани, так как выходит в кровь и митохондриальная форма фермента. Особенно информативно одновременное измерение активности АсАТ и других ферментов, в частности аланинаминотрансферазы (АлАТ).

АлАТ (КФ 2.6.1.2). Фермент катализирует реакцию трансаминирования между аланином и α -кетоглутаратом.



Активность АлАТ в сыворотке крови в норме мала — всего 5—40 Е/л. Она увеличивается через 4—6 ч после начала заболевания, но в значительно меньшей степени, чем активность АсАТ. В норме коэффициент де Ритиса (соотношение активностей АсАТ/АлАТ) равен $1,33 \pm 0,42$. При инфаркте миокарда значение его резко возрастает.

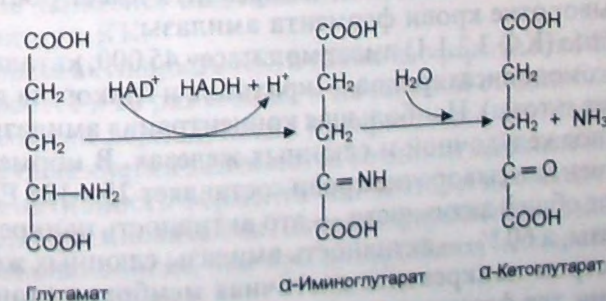
При стенокардии, пороках сердца, инфаркте легкого активность аминотрансфераз в крови не увеличивается.

В последнее время для диагностики ОИМ, кроме активности ферментов, в крови определяют уровень белков — тропонина Т и тропонина I (комплекс белков волокон сердечной мышцы). Количество тропонина Т и тропонина I при ОИМ увеличивается через 3,5—10 ч и сохраняется повышенным до 2—3 нед. Для определения содержания этих белков используют метод иммуноферментного анализа. Метод обладает высокой чувствительностью и более специфичен, чем определение активности изофермента ККМВ.

Диагностика болезней печени. Из паренхиматозных клеток печени ферменты могут высвобождаться в результате острого и хронического их нарушения.

Один из ранних тестов, который позволяет диагностировать поражение печени, — определение активности ЩФ. Этот фермент катализирует отщепление фосфатной группы от органических соединений — эфиров фосфорной кислоты. В норме общая активность ЩФ в крови составляет 37—196 Е/л, а печеночного изофермента — 20—130 Е/л (у взрослых). Активность может повышаться в 6 раз и более при первичных или вторичных новообразованиях печени, печеночном холестазе, циррозе печени.

Глутаматдегидрогеназа (ГлДГ; КФ 1.4.1.2) — один из специфических печеночных ферментов; катализирует реакцию дезаминирования глутаминовой кислоты.



Активность ГлДГ в крови в норме (ориентировочно) составляет 0—1,2 Е/л. Фермент локализуется в митохондриях гепатоцитов, поэтому в сыворотке крови активность его по-

вышается только при тяжелых некротических повреждениях клеток: остром гепатите, обострении хронического гепатита (некротические формы), печеночной коме, обтурационной желтухе. Активность ГлДГ снижается до нормы значительно раньше, чем происходит функциональная нормализация гепа-тоцитов, поэтому измерение активности фермента не может использоваться как критерий выздоровления.

γ -Глутамилтранспептидаза (ГГТ) (КФ 2.3.2.2) катализирует перенос γ -глутамильного остатка с пептида на аминокислоту или другой пептид. Активность фермента в крови в норме (ориентировочно) равна у женщин 10—66 Е/л, у мужчин — 18—100 Е/л. Повышается активность при заболеваниях печени и желчевыводящих путей. В желчи активность ГГТ примерно в 100 раз выше, чем в сыворотке крови. Определение активности фермента используется для диагностики безжелтушных и малосимптомных гепатитов, метастазов в печень.

Для диагностики и прогноза болезней печени клиницисты чаще всего определяют активность АлАТ, АсАТ и ЛДГ. В инкубационном периоде острого инфекционного гепатита активность этих ферментов в сыворотке крови остается в норме (см. ранее), но уже в начальной стадии заболевания начинает резко увеличиваться (особенно активность АлАТ), хотя другие клинические признаки (желтуха) еще отсутствуют. Это особенно важно для ранней диагностики гепатита.

Активность АлАТ и АсАТ в первые 2—3 нед болезни повышается в 10—15 раз, причем коэффициент де Ритиса снижается до 0,6. При циррозе печени наблюдается увеличение этого коэффициента, что свидетельствует о некрозе клеток, при котором в кровь выходит и митохондриальная АсАТ, а клетки печени заменяются фиброзной тканью.

Диагностика болезней органов пищеварения. Панкреатит — воспалительное заболевание поджелудочной железы. Наибольшее значение при диагностике панкреатита имеет рост активности в сыворотке крови фермента амилазы.

α -Амилаза (КФ 3.2.1.1) имеет мол.массу 45 000; катализирует гидролиз гомополисахаридов — крахмала и гликогена до дисахаридов (мальтозы). Наибольшая концентрация амилазы обнаружена в поджелудочной и слюнных железах. В норме активность фермента в сыворотке крови составляет 25—125 Е/л, причем 40 % от общей активности — это активность панкреатической амилазы, а 60 % — активность амилазы слюнных желез.

При остром панкреатите клеточная мембрана становится проницаема для ферментов в результате развития воспаления и воздействия повышенного давления, характерного для закупорки протока поджелудочной железы. Активность панкреатической амилазы в крови быстро увеличивается — через 2—

4 ч после начала приступа, через 12 ч достигает максимума и может превысить норму в 5—10 раз. Спустя 2—5 дней после начала болезни активность амилазы снижается до нормальных значений. Если активность фермента остается увеличенной более 5 сут, то, следовательно, воспалительный процесс продолжается и лечение неэффективно. Активность амилазы повышается также при хроническом панкреатите, холецистите, перитоните и при алкоголизме, однако эти изменения значительно менее достоверны.

Амилаза — один из немногих ферментов с достаточно низкой молекулярной массой, который попадает в мочу. Поэтому активность амилазы определяют и в моче, что позволяет в более отдаленные сроки диагностировать острый панкреатит. Повышенное выделение фермента с мочой сохраняется в течение 7—10 дней, несмотря на то, что активность его в крови уже через 3—4 дня приходит в норму.

Активность других панкреатических ферментов (например, липазы) при остром панкреатите увеличивается аналогично амилазе. Их активность может оставаться повышенной в крови даже более продолжительное время, но методы их определения менее чувствительны и достоверны.

Диагностика болезней мышц. Наиболее часто встречающейся патологией скелетных мышц являются воспаление мышечной ткани (миозит), механическое повреждение клеток мышц, дистрофии (миопатии). Эти болезни сопровождаются повреждением или полным разрушением клеток и выходом внутриклеточных ферментов в кровь. Для диагностики заболеваний скелетных мышц в сыворотке крови определяют активность следующих ферментов: КК, ЛДГ, АлАТ, АсАТ и альдолазы (КФ 4.1.2.13).

При мышечных дистрофиях (особенно при дистрофии Дюшенна) повышается активность всех перечисленных ферментов, но наиболее надежным показателем является изменение активности КК.

Общая активность КК, а также изоферментов МВ и ММ увеличивается в 10 раз и более в начальной стадии болезни. В более поздний период, когда прекращается активный процесс и мышечные клетки заменяются соединительной и жировой тканями, активность фермента снижается и достигает нормы (см. ранее). При миозитах активность ферментов в сыворотке крови несколько ниже, чем при дистрофиях, но характер этих изменений такой же.

Измерение активности КК используют для оценки эффективности лечения больных полимиозитом.

Следует иметь в виду, что активность КК в сыворотке крови может повышаться при больших физических нагрузках,

после хирургических вмешательств и внутримышечных инъекций.

При болях мышц нейрогенного происхождения (полиомит, паркинсонизм и др.) активность всех указанных ферментов в сыворотке крови остается в норме.

Диагностика болезней почек. При различных поражениях почек в сыворотке крови изменяется активность некоторых ферментов. Так, при почечной недостаточности активность липопротеинлипазы (КФ 3.1.1.3) снижается (в норме активность фермента очень мала и ее определяют после введения гепарина). Активность амилазы увеличивается незначительно. Очевидно, что такое изменение активности ферментов недостаточно информативно.

Для диагностики поражений почек в настоящее время в клинике определяют активность ферментов в моче — ферментурию. Так, при хроническом пиелонефрите в моче обнаруживается значительная активность β -глюкуронидазы (КФ 3.2.1.31), лизоцима (КФ 3.2.1.17) и ЛДГ. В корковом веществе почек содержится преимущественно изофермент ЛДГ₁, а в мозговом — ЛДГ₅. При пиелонефрите поражается в основном мозговое вещество, поэтому наиболее специфичным тестом является определение активности ЛДГ₅.

Наиболее чувствительный тест для диагностики гломерулонефрита — определение активности в моче β -N-ацетилглюкозаминидазы (НАГ; КФ 3.2.1.30). Этот фермент гидролитически отщепляет концевые нередуцирующие остатки 2-ацетамидо-2-дезоксиглюкозы в хитобиозе, ацетилглюкозаминидах и гликопротеинах. Активен НАГ в лизосомах клеток проксимальных отделов тубулярного аппарата почек. Повышение активности фермента хорошо коррелирует с экскрецией альбумина и активностью патологического процесса при хроническом гломерулонефрите. НАГ выявляли в моче и на ранних стадиях диабетической нефропатии. Многие ферменты, синтезирующиеся в клетках почечных канальцев и обнаруживаемые в моче, исследовали с точки зрения возможной роли в диагностике реакции отторжения пересаженной почки.

В рассмотренных примерах изменения ферментативной активности в сыворотке крови обусловлены деструктивными или повреждающими воздействиями на содержащие фермент клетки. Некоторые ферменты могут попадать в кровь без видимого структурного повреждения клеток, в которых они синтезируются. Это объясняется тем, что такие ферменты секретируются и функционируют в крови либо синтезирующие их клетки расположены достаточно удобно для легкого переноса фермента во внеклеточную жидкость, а затем в кровь. В этих случаях изменения активности ферментов в крови свидетель-

Таблица 1.3

Механизмы изменения активности ферментов в сыворотке крови
[Клинический диагноз — лабораторные основы. — М., 1997]

ПОВЫШЕНИЕ АКТИВНОСТИ	
Повышение синтеза	ЩФ (рахит)
Повышение проницаемости мембран	КК (прогрессирующая мышечная дистрофия)
	АлАТ, АсАТ (вирусный гепатит)
Некроз клеток	АсАТ, альдолаза, КК
Понижение выведения	ЩФ, ЛАП (закупорка желчных путей)
ПОНИЖЕНИЕ АКТИВНОСТИ	
Уменьшение числа клеток, секретирующих фермент	ХЭ (цирроз печени)
Избирательная недостаточность синтеза	Пепсиноген (гастрэктомия)
	Церулоплазмин (болезнь Вильсона)
	ЩФ (гипофосфатазия)
Усиление выделения фермента	Церулоплазмин (нефроз)
Торможение активности фермента	Трипсин (под влиянием антитрипсина)

ствуют о ферментсинтезирующей активности клеток или о количестве таких клеток.

Возможные механизмы изменения активности некоторых ферментов в крови представлены в табл. 1.3. Например, повышение количества и активности клеток, продуцирующих ЩФ, объясняет изменение активности этого фермента в сыворотке крови при определенных видах костных заболеваний (костный изофермент ЩФ). Синтезируют ЩФ остеобласты, из них фермент выделяется в кровь. У детей в норме активность этого фермента в сыворотке крови значительно выше, чем у взрослых, и коррелирует с интенсивностью роста костей. По мере замедления роста активность ЩФ в сыворотке крови снижается. При всех костных заболеваниях, сопровождающихся увеличением образования костной ткани, активность ЩФ увеличивается. Так, при болезни Педжета (деформирующий остит) активность ЩФ в сыворотке крови увеличивается в 20 раз.

Кислая фосфатаза (КФ, оптимум рН 4,9), так же как щелочная, обладает низкой специфичностью к субстратам. Этот фермент широко распространен в тканях и имеет тканеспецифические изоформы. У мужчин наибольшая активность КФ

выявлена в предстательной железе (в 400 раз больше, чем в других тканях). Локализована КФ в лизосомах. Простетическая изоформа локализуется в лизосомах эпителия предстательной железы и представляет собой гликопротеин с мол.массой 100 000. Фермент секретируется в семенную жидкость, незначительная часть его попадает в мочу, а в кровь поступает очень мало. Активность КФ в норме в сыворотке крови составляет 0—0,6 Е/л. При раке предстательной железы без метастазов активность КФ увеличивается незначительно (примерно у 25 % больных). Однако при вторичных опухолях активность КФ значительно возрастает у более чем 80 % больных. Это обусловлено появлением большого числа клеток, синтезирующих КФ, и более легким проникновением фермента в кровь, так как метастатические опухоли не окружены капсулой, как сама железа. Иммунохимические методы высокоспецифичны для простатической КФ, однако, поскольку уровень фермента не повышается на ранних стадиях болезни железы, тест не рекомендуется для использования при скрининге. Он может быть применен для контроля за течением болезни.

Другим маркером рака предстательной железы является *простатический специфический антиген* (ПСА). Чувствительность его выше, чем у КФ. ПСА — это сериновая протеаза с химотрипсинподобной активностью. У 80 % мужчин количество ПСА в крови в норме менее 4 мкг/л (4 нг/мл), у 20 % — до 20 мкг/л. Содержание антигена увеличивается при раке и доброкачественной гиперплазии предстательной железы, а после лечения снижается до нормы. Определение количества ПСА рекомендуется для наблюдения за лечением.

В настоящее время известно много ферментов, являющихся маркерами опухолей. Так, активность ЛДГ, ЩФ (изофермент) повышается при опухолях зародышевых клеток, ЩФ (изофермент) — при опухолях костей, злокачественных метастазах, амилазы — при некоторых опухолях легких и яичников. При опухолях различной локализации определяют активность в крови тимидинкиназы, галактозилтрансферазы II, катепсина (формы В и D), урокиназы, глутатионтрансферазы и др.

1.3.2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ В КАЧЕСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

В последние годы в клинической практике все чаще используют различные ферментные препараты при лечении ряда заболеваний. Этому предшествовали исследования по использованию органами и тканями парентерально введенных фермен-

тов, всасыванию протеолитических и других ферментов, введенных перорально и ректально. Результаты этих исследований значительно ускорили развитие энзимотерапии.

В настоящее время в качестве лекарственных препаратов наиболее широко применяются протеолитические ферменты. Пепсин (КФ 3.4.23.1) и панкреатин, содержащий трипсин (КФ 3.4.21.4) и химотрипсин (КФ 3.4.21.1), используются в качестве средств заместительной терапии при нарушении функции пищеварительных желез.

Протеиназы расщепляют в основном некротические массы денатурированных белков и практически не действуют на нативные. Энзиматический лизис является методом избирательного удаления нежизнеспособных тканей. Такое направленное действие протеиназ объясняется тем, что в живых тканях находятся специфические ингибиторы, тормозящие действие ферментов. В связи с этим высокоочищенные кристаллические препараты протеиназ используются как эффективные противовоспалительные средства. Трипсин в хирургической практике применяют для растворения сосудистых тромбов; трипсин и химотрипсин при легочных заболеваниях — для удаления омертвевших тканей и разжижения фибринозно-гнойного экссудата при эмпиеме плевры, туберкулезе легких. При заболеваниях дыхательных путей (бронхит, бронхиальная астма, бронхоэктазы и др.) трипсин используется для разжижения мокроты, уменьшения одышки, кашля; в офтальмологии — для устранения тромбоза центральной вены сетчатки, при гематомах век и конъюнктивы. В стоматологии трипсин и химотрипсин применяют при пульпитах, альвеолитах, периодонтитах.

Применение трипсина и гиалуронидазы (КФ 3.2.1.35 и 36) в комплексе с другими методами дает хорошие результаты при лечении ожогов.

Урокиназа (КФ 3.4.99.26) и стрептокиназа (КФ 3.4.99.22) используются в тромболитической терапии.

Плазмин (КФ 3.4.21.7), РНКазы и гиалуронидаза тормозят рост злокачественных опухолей и процесс метастазирования.

1.3.3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТОВ В КАЧЕСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Активность ферментов в большой степени зависит от присутствия в среде эффекторов — активаторов и ингибиторов. Первые увеличивают ферментативную активность, а вторые тормозят ее. Достижения биохимии, патофизиологии и фармакологии позволили расшифровать механизм действия многих

Некоторые лекарственные вещества, являющиеся регуляторами активности ферментов

Группа по фармакологическому действию	Биохимический (физиологический) эффект	Фермент(ы)-мишень	Основные препараты	Показания к применению
Нестероидные противовоспалительные	Ингибиторы синтеза простагландинов	Циклооксигеназа (простагландинсинтаза)	Ацетилсалициловая кислота, индометацин, вольтарен, теноксикам и др.	Повышение температуры тела, миалгия, артралгия, невралгия, ревматизм и др.
Спазмолитические	Ингибиторы метаболизма циклических нуклеотидов	Фосфодиэстераза цАМФ	Ксантинол (компламин), пентоксифиллин (трентал), теобромин и др.	Нарушения периферического кровообращения, ангиопатии, ретинопатии и др.
Гипотензивные (антигипертензивные)	Ингибиторы синтеза ангиотензина II	Карбоксидипептидилпептидаза	Каптоприл, эналаприл, квинаприл	Гипертоническая болезнь (эссенциальная, почечная формы)
Антиагрегационные, антитромботические	Ингибиторы синтеза катехоламинов	Дофамин-β-монооксигеназа	Метилдофа (допегит)	Гипертоническая болезнь IIА и IIБ стадий
	Ингибиторы синтеза тромбксана	Тромбксансинтетаза	Дазоксiben, пирмаг-рел	Коагулопатии (гиперкоагуляция), тромбозы, обильные поражения

препаратов, в том числе уже давно используемых в клинике. Для действия большинства из них мишенью является фермент, изменение активности которого благоприятно влияет на течение заболевания. Оказалось, что большинство лекарственных препаратов снижает скорость ферментативных реакций или полностью их блокирует, т.е. является ингибиторами.

В настоящее время применение ингибиторов ферментов — важная и перспективная область энзимотерапии.

Лекарственные вещества, влияющие на активность ферментов, различны по своему происхождению. Большее число препаратов является продуктом химического синтеза, другие получают из клеток микроорганизмов, растений или животных.

Одни препараты являются ингибиторами активности ферментов патогенных бактерий, другие активны только в отношении ферментов макроорганизма.

К первой группе относятся, например, антибактериальные антибиотики (пенициллины, цефалоспорины и др.), сульфаниламидные препараты, блокирующие ферменты синтеза фолиевой кислоты у бактерий (сульфадимезин, сульфадиметоксин, стрептоцид и др.), ингибиторы β-лактамаз бактерий, которые гидролизуют β-лактамы антибиотиков (сальбактам, клавулановая кислота и др.).

Вторая группа включает большое количество препаратов, оказывающих специфическое действие и обладающих высокой активностью и большой избирательностью (табл. 1.4). Многие лекарственные средства, длительно используемые в медицине, оказались ингибиторами активности ферментов. Так, салициловая кислота и ее производные применялись как противовоспалительные средства задолго до открытия простагландинов и ферментов, регулирующих их синтез.

Определены показания к клиническому применению регуляторов активности ферментов:

1) дефицит естественных ингибиторов, которые ограничивают влияние эндогенных ферментов или защищают их от повреждающего действия чужеродных ферментов (бактериальных). Например, недостаток α₁-антитрипсина (антипротеазный ингибитор) — одного из более 10 ингибиторов белковой природы, находящихся в плазме крови, приводит к эмфиземе легких, так как при этом значительно возрастает протеолитическое действие эластазы на ткань легкого;

2) заболевания, связанные с гиперфункцией ферментов (преждевременная их активация, аномальный выброс в кровь и ткани); например, острый панкреатит, в патогенезе которого большую роль играют многочисленные

Группа по фармакологическому действию	Биохимический (физиологический) эффект	Фермент(ы)-мишень	Основные препараты	Показания к применению
Антили-пидемические, антидиабетические	Ограничение всасывания глюкозы из кишечника	α -Глюкозидаза	Акарбоза	Диабет, ожирение
1. Анти-депрессанты 2. Психостимуляторы	Ингибиторы окислительного дезаминирования нейромедиаторов – моноаминов	Моноаминоксидазы типов А и В	1. Нуредаль, инказан (метралиндол) 2. Индопан	Депрессивные состояния; вялость, апатия психического происхождения
Антидиабетические	Подавление восстановления глюкозы (галактозы) в сорбитол (галактитол)	Альдозоредуктаза	Сорбинил, толпрестат, алрестатин	Диабетическая катаракта, диабетические нейропатии (?)
Действующие на периферические холинергические процессы	Накопление ацетилхолина в холинергических рецепторах	Холинэстераза	Оксазил, прозерин, фосфакол и др.	Миастения, невриты, атония кишечника и мочевого пузыря, глаукома и др.
Химиотерапевтические	Подавление активности ферментов, инактивирующих β -лактамы	β -Лактамазы	Клавулановая кислота, сальбактам	Инфекционные заболевания (применяются с β -лактамами антибиотиками)
Противоопухолевые	Ингибиторы синтеза полинуклеотидов	РНК-полимераза, ДНК-полимераза и тимидилатсинтаза, дигидрофолатредуктаза	5-Фторурацил, метотрексат и др.	Злокачественные опухоли, лейкоз, лимфогранулематоз

гидролазы, образующиеся в ткани поджелудочной железы. Основная роль на ранней стадии заболевания принадлежит трипсину и химотрипсину, поэтому в качестве лекарственного средства используют ингибиторы этих ферментов трасилол, контрикал и др.;

- 3) проникновение в организм чужеродных ферментов (бактериальных) или введение их больному в качестве лекарственного препарата в неадекватной дозе: например, антибактериальных антибиотиков и сульфаниламидных препаратов.

Среди соединений, являющихся лекарственными препаратами, представлены ингибиторы всех классов ферментов. Особенно много ингибиторов оксидоредуктаз и гидролаз. Таким образом, области применения ферментов в медицине чрезвычайно широки.

В настоящее время клиническая энзимология уверенно развивается как важная составляющая часть клинической лабораторной медицины.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ

1. Мужчина 52 лет обратился к врачу с жалобами на продолжительные загрудинные боли, удушье. Предварительный диагноз — «инфаркт миокарда». Какие специфические биохимические тесты необходимо провести для подтверждения диагноза?

2. При биохимическом исследовании крови обнаружили резкое повышение активности ЛДГ, АсАТ и АлАТ. Коэффициент де Ритиса равен 3,85.

А. Какое заболевание можно предположить у обследуемого?

Б. Активность еще какого фермента в сыворотке крови будет повышена?

3. Больной поступил в клинику с диагнозом «острый панкреатит». Активность каких ферментов в сыворотке крови будет повышена по сравнению с нормой:

А. Аланинаминотрансферазы.

Б. α -Амилазы.

В. Лактатдегидрогеназы.

Г. Глутаматдегидрогеназы.

Д. Панкреатической липазы.

4. При биохимическом исследовании крови больного получили следующие результаты:

Фермент	Активность, Е/л
ЩФ	800
АлАТ	45
АсАТ	33

Нарушение функции какого органа можно предположить у обследованного?

5. У больного 62 лет предварительный диагноз «рак предстательной железы». Активность кислой фосфатазы в крови выше нормы.

А. Какой еще биохимический анализ нужно провести для уточнения диагноза?

Б. Какие результаты анализа подтвердят диагноз?

6. Протеиназы расщепляют в основном некротические массы денатурированных белков и практически не действуют на нативные. Выберите ферменты, используемые при легочных заболеваниях для удаления омертвевших тканей и разжижения мокроты.

А. Пепсин.

Б. Трипсин.

В. Аминопептидаза.

Г. Химотрипсин.

Д. Энтеропептидаза.

7. Больному ревматоидным артритом назначили индометацин и(или) вольтарен. Объясните механизм действия этих лекарственных средств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Врожденные и приобретенные энзимопатологии*/Под ред. Т.Ташева: Пер. с болг. — М.: Медицина, 1980.
2. Долгов В., Морозова В., Марцишевская Р. и др. Клинико-диагностическое значение лабораторных показателей. — М.: Центр, 1995.
3. *Клинический диагноз — лабораторные основы*/Под ред. В.В.Меньшикова. — М.: Лабинформ, 1997.
4. Кондратенко Т.Я. Биохимическое исследование крови как метод диагностики заболеваний (методические рекомендации)/Институт прикладной молекулярной биологии Минздрава СССР. — М., 1988.
5. Марри Р. и др. Биохимия человека. — М.: Мир, 1993.
6. Меньшиков В.В. Клиническая лабораторная диагностика. — 1996. — № 6. — С. 51—52.
7. Мосс Д.В., Баттерворт П.Дж. Энзимология и медицина. — М.: Медицина, 1978.
8. Gaw A., Cowan R.A., O'Reilly D.Y. et al. Clinical Biochemistry. — Churchill Livingstone, 1995.
9. Zliva Y.R., Pannall P.R. Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment. — London: Lloyd-Luke (Medical Books); LTD, 1984.

Глава 2

АПОПТОЗ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Динамическое равновесие обновляющихся тканей связано с двумя разнонаправленными процессами: митотическим размножением и гибелью клеточных популяций. Гибель клеток играет чрезвычайно важную роль в формировании и функционировании многоклеточных организмов. Нарушение нормального контроля гибели клеток вызывает изменение гомеостаза и приводит к различным патологическим заболеваниям. Длительное время значение гибели клеток недооценивалось. В последние годы интерес к этому явлению значительно возрос и эта проблема стала одной из самых изучаемых в биологии.

К настоящему времени различают два типа гибели клеток: некроз и апоптоз. **Некроз** является наиболее частой неспецифической формой гибели клеток. Он может быть вызван тяжелыми повреждениями клетки в результате прямой травмы, радиации, влияния токсических агентов, вследствие гипоксии, лизиса клеток, опосредованного комплементом, и т.д. В отличие от некроза апоптоз — это запрограммированная гибель клеток, вызываемая внутренними или внешними сигналами, которые сами по себе не являются токсичными или деструктивными. Апоптоз представляет собой активный процесс, требующий затрат энергии, транскрипции генов и синтеза белка *de novo*. Применение ингибиторов синтеза АТФ, белка и транскрипции генов замедляет процесс апоптоза. Аналогичной зависимости в случае некротической гибели клетки нет. Очевидно, что некроз и апоптоз различаются по морфологическим и биохимическим проявлениям. Сравнение этих двух форм гибели клеток возможно с помощью биохимических и электронно-микроскопических исследований.

Как отмечалось, апоптоз — запрограммированная гибель клетки, поэтому воздействие на определенные генетические и биохимические пути регуляции этого процесса открывает перспективу корректировать эту программу. Кроме того, апоптоз определенных типов клеток вызывается различными сигналами, что обуславливает специфичность регуляции апоптоза в разных типах клеток.

2.1. АПОПТОЗ В ИММУННОЙ СИСТЕМЕ

Апоптоз играет важную роль в развитии и функционировании иммунной системы: в установлении толерантности к аутоантигенам в период созревания тимоцитов в тимусе, где погибает 95—98 % тимоцитов в результате отрицательной селекции; в периферических органах иммунной системы в процессе селекции лимфоцитов при лигандрецепторных взаимодействиях; при активации лимфоцитов; при ограничении иммунного ответа после элиминации гаптена. Цитотоксические лимфоциты вызывают гибель клеток-мишеней, индуцируя в них апоптоз. Апоптоз является тем механизмом, который обуславливает элиминацию лимфоцитов с генными мутациями или с неадекватной специфичностью рецепторов. Следовательно, апоптоз является тем механизмом, который организм использует для освобождения от чужеродных клеток, клеток с дефектным генетическим аппаратом, аутоагрессивных лимфоцитов и «отработавших» клеток иммунной системы, которые успели выполнить свою функцию. Являясь общебиологическим механизмом, ответственным за поддержание постоянства численности клеток, формообразование, выбраковку дефектных клеток, апоптоз и в границах иммунной системы выполняет аналогичные функции, но обогащается при этом специфической компонентой благодаря тому, что реализуется, как правило, на уровне клонов лимфоцитов.

Накопленные в литературе сведения позволяют выделить в клетках иммунной системы процессы, индуцирующие апоптоз: 1) накопление повреждений в ДНК клеток; 2) элиминация либо недостаток необходимых ростовых факторов или молекул, обеспечивающих выживаемость клеток; 3) связывание специфических рецепторов R: фактора некроза опухоли, Fas, CD30, CD40 и некоторых других. Каждый процесс вызывает каскад разнообразных внутриклеточных реакций, приводящих в итоге к активации аспарагинспецифических протеаз (каспаз): CED-3, ICE, ICH, CPP32 и др. После этого апоптоз переходит в необратимую стадию, в то время как до индукции протеаз апоптоз может быть блокирован. Рассмотрим эти события, приводящие клетку к апоптозу, более подробно.

2.1.1. МЕХАНИЗМ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА ПРИ СВЯЗЫВАНИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ

Наиболее хорошо изучена последовательность событий, приводящих клетку к апоптозу в результате взаимодействия белка Fas (Fas-R, его же обозначают как CD95 или apo-1) с

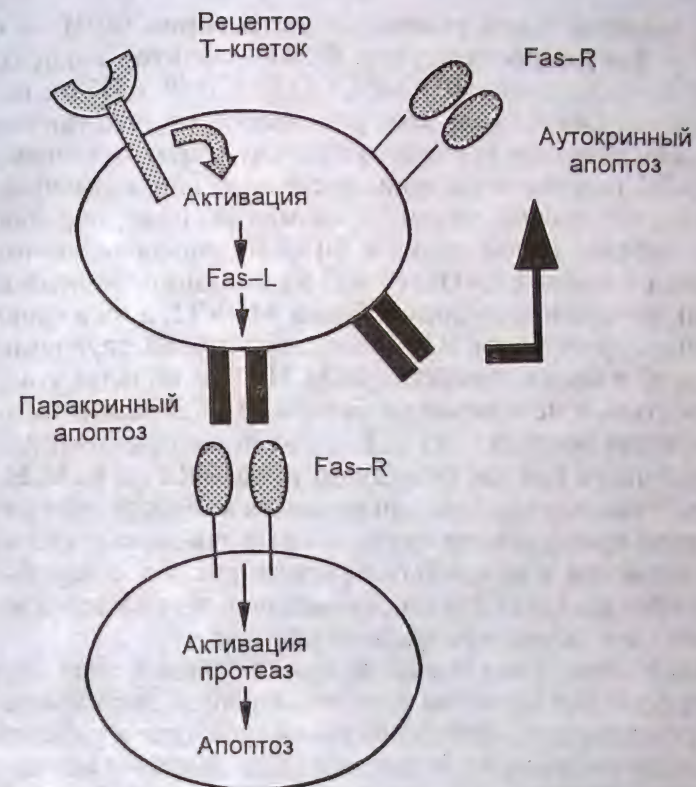


Рис. 2.1. Индукция апоптоза системой Fas-L — Fas-R.

Fas-лигандом (Fas-L) (рис. 2.1). Взаимодействие Fas-L с Fas-R имеет место при ограничении иммунного ответа на стадии гиперэкспрессии специфических клонов Т-лимфоцитов. Fas-R конститутивно экспрессируется на поверхности клеток многих типов: на кортикальных тимоцитах, лимфобластоидных клеточных линиях, активированных Т- и В-лимфоцитах, а также на фибробластах, гепатоцитах, кератиноцитах, миелоидных клетках. Fas-L экспрессируется при активации на Т-лимфоцитах, а также на сустентоцитах (клетки Сертоли) и паренхимных клетках передней камеры глаза, что позволяет этим клеткам убивать любую Fas-экспрессирующую клетку, в том числе и активированный Т-лимфоцит. Этот механизм определяет появление защищенных от иммунной системы тканей.

Fas-L — это трансмембранный белок с мол. массой 40 000. Fas-R — также трансмембранный белок с мол. массой 36 000—45 000. Он кодируется одноименным геном, который локализуется на хромосоме 10q23 у человека и хромосоме 19 — у мыши.

Ряд рецепторов, аналогичных Fas по способности индуцировать апоптоз после их связывания со специфическими лиган-

дами, выделяют как семейство рецепторов ФРН — ФНО (ФРН — фактор роста нервов, ФНО — фактор некроза опухоли). Это рецепторы ФНО-RI, CD30, CD40, CD27 и некоторые другие. Связывание этих рецепторов со специфическими лигандами индуцирует апоптоз по следующему механизму. Fas и ФНО-RI, помимо нескольких экстраклеточных доменов, имеют цитотоксический домен — «домен смерти», передающий сигнал гибели. Такой домен в ФНО-RI способен взаимодействовать с белком TRADD (ФНО-RI ассоциированный домен смерти), который индуцирует белок MORT1, а он в свою очередь индуцирует белок RIP (белок, взаимодействующий с рецептором) и белки семейства MACH. RIP обладает киназной активностью, а некоторые из белков MACH являются членами семейства протеаз типа ICE. «Домен смерти» цитоплазматической части Fas также индуцирует MORT1 и MACH.

Мембраны клеток, подвергающихся апоптозу, уже на ранних этапах претерпевают значительные изменения, что позволяет фагоцитам и макрофагам распознавать и очень быстро элиминировать такие клетки, не вызывая повреждения клеток окружающих тканей продуктами распада.

В настоящее время показана прямая связь между нарушениями регуляции апоптоза клеток иммунной системы посредством рецепторспецифического взаимодействия и различными заболеваниями иммунной системы. Критическим моментом в регуляции апоптоза иммунной системы является выработка рецептора Fas. Мутации в гене, кодирующем рецептор Fas/apo-1, индуцируют процесс образования опухоли. Так, у больных с различными видами опухолей лимфоидной ткани часто обнаруживают Fas с измененной структурой.

При различных аутоиммунных заболеваниях (системная красная волчанка, ревматоидный артрит) в сыворотке крови и жидких средах организма часто выявляют растворимые формы Fas-R, которые обуславливают нарушение апоптоза, достаточное для развития системного аутоиммунного процесса. Установлено, что к болезням, в патогенезе которых важное место принадлежит апоптозу, относят такие аутоиммунные заболевания, как псориаз, инсулинзависимый сахарный диабет и ряд других.

2.1.2. МЕХАНИЗМ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА ПРИ ИСКЛЮЧЕНИИ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ

Важная роль в регуляции апоптоза клеток иммунной системы принадлежит другим цитокинам: интерлейкинам, интерферонам, факторам роста. Интенсивно ведутся работы по

выяснению апоптогенного действия интерлейкинов (ИЛ). Установлено, что они являются индукторами апоптоза как в здоровых, так и в злокачественных клетках и клеточных линиях. Например, ИЛ-2 и ИЛ-12 индуцируют апоптоз у натуральных киллеров, ИЛ-4 и ИЛ-10 — в периферических моноцитах человека, ИЛ-10 — в Т-лимфоцитах. Однако не только роль индукторов апоптоза свойственна интерлейкинам. Не менее выраженный эффект цитокинов наблюдается в предотвращении апоптоза, при этом один и тот же интерлейкин может быть как индуктором апоптоза, так и его ингибитором. Различия в ответе разных клеток-мишеней, возможно, зависят от степени их дифференцировки и развития. Так, ИЛ-1 является индуктором апоптоза для клеток мышинной тимомы, находящихся в фазе плато, и ингибитором апоптоза для этих же клеток, находящихся в фазе роста. ИЛ-2 — ингибитор апоптоза в Т- и В-лимфоцитах. ИЛ-4 ингибирует апоптоз также в Т- и В-лимфоцитах. ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-9 известны только как ингибиторы апоптоза клеток.

Неоднозначна роль интерферонов (ИФ) по влиянию на клетки. В одних случаях ИФ вызывает апоптоз (клетки костного мозга), в других — является ингибитором апоптогенного сигнала (периферические моноциты человека).

В результате взаимодействия лигандов со специфическими рецепторами происходит активация апоптозспецифических сигналпередающих систем (система фосфолипазы С, церамида, кальция, активных форм кислорода и т.д.), что приводит к активации апоптозспецифических генов и запуска программы апоптоза.

Интересны данные о регуляции апоптоза пептидными ростовыми факторами. Имеются убедительные сведения, что факторы роста предотвращают развитие апоптоза в клетках, так как удаление факторов роста из культуры клеток приводит к типичным апоптотическим проявлениям. Механизмы развития апоптоза при исключении факторов роста клеток из питательной среды пока неясны. Полагают, что в присутствии таких молекул в среде постоянно имеется некий фактор, способный ингибировать запрограммированную гибель клеток. Поэтому исключение ростовых факторов отменяет этот сдерживающий сигнал развития апоптоза и тем самым индуцирует гибель клеток.

Не менее важная роль в регуляции апоптоза клеток иммунной системы отводится гормональной регуляции. В эндокринологии давно известно, что удаление эндокринной железы приводит к массовой инволюции клеток-мишеней. Механизм этого явления долго не был известен, и только открытие явления апоптоза дало толчок к изучению процес-

сов, лежащих в основе действия гормонов на жизнеспособность клеток.

Центральное место в исследовании действия гормонов по индукции апоптоза принадлежит влиянию глюкокортикоидов (ГК) на лимфоидные клетки. Чувствительность незрелых тимоцитов к ГК-индуцированному апоптозу характерна для многих биологических видов, в том числе для человека, грызунов и птиц. Чувствительность Т-клеток к ГК зависит от стадии развития лимфоцитов. Пре-Т-клетки костного мозга и незрелые Т-клетки тимуса чувствительны к физиологическим дозам ГК. Ранее считалось, что зрелые медуллярные тимоциты и периферические лимфоциты резистентны к ГК. Однако недавно было показано, что определенные субпопуляции зрелых Т-лимфоцитов (натуральные киллеры, цитотоксические Т-лимфоциты) претерпевают апоптоз под действием ГК. В-клетки также чувствительны к ГК в зависимости от стадии своего развития. Пре-В-клетки и незрелые В-клетки гибнут путем апоптоза под действием ГК. Зрелые В-лимфоциты нечувствительны к ГК.

Действие ГК опосредовано внутриклеточными специфическими рецепторами. ГК-R, связывая лиганд, регулирует транскрипцию глюкокортикоидчувствительных генов. Уровень чувствительности лимфоидных клеток к ГК-индуцированному апоптозу определяется концентрацией рецептора и аффинностью лиганда к рецептору. Последовательность событий, происходящих от активации ГК-R до гибели клеток, не совсем ясна. Одни исследователи считают, что активированный ГК-R запускает экспрессию так называемых лизисных генов, так как ингибиторы трансляции и транскрипции блокируют его действие. Другие ученые полагают, что его эффект связан скорее с репрессией генов, чем с активацией. Экспериментальные данные демонстрируют, что ГК повышают экспрессию кальмодулина, снижают продукцию ИЛ-2, увеличивают концентрацию внутриклеточного cAMP, резко повышают уровень формирования активных форм кислорода и т.д.

Таким образом, в функционировании иммунной системы апоптоз является тем механизмом, который обуславливает элиминацию лимфоцитов с «неправильной» специфичностью рецепторов, составляет основную сущность отрицательной селекции потенциально аутоагрессивных лимфоцитов и элиминации чужеродных для организма клеток цитотоксическими лимфоцитами. Патология апоптоза в клетках иммунной системы является основой в развитии лимфопролиферативных, аутоиммунных и иммунодефицитных заболеваний.

2.2. АПОПТОЗ И ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Клетки большинства опухолей обладают пониженной способностью запускать механизмы клеточной гибели в ответ на некоторые физиологические стимулы. Метаболизм опухолевых клеток изменен таким образом, что клетки сохраняют свою жизнеспособность в условиях, сильно отличающихся от тех, в которых они появились, что и обеспечивается созданием определенной независимости от факторов, регулирующих апоптоз. Исследования последних лет проливают свет на молекулярные основы увеличения резистентности опухолевых клеток к факторам, индуцирующим апоптоз.

2.2.1. РОЛЬ БЕЛКА Bcl-2 В РАЗВИТИИ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Прежде всего следует отметить нарушение регуляции апоптоза, связанное с экспрессией одного из основных звеньев в регуляции запрограммированной гибели клетки — белков семейства Bcl-2. При онкологических заболеваниях наблюдается гиперэкспрессия этого белка, что приводит к повышению жизнеспособности опухолевых клеток. Увеличение экспрессии этого гена обеспечивает резистентность этих клеток к ряду химиопрепаратов (винкристин, цисплатин, метотрексат и др.). Данный факт стал основой гипотезы о роли Bcl-2 в фенотипе множественной лекарственной устойчивости.

Первоначально ген bcl-2 был обнаружен в клетках В-клеточной лимфомы человека, имеющей транслокацию t(14, 18) с точкой разрыва q21 хромосомы 18, которая находится в непосредственной близости к гену тяжелых цепей IgH, обладающему высокой транскрипционной активностью. Bcl-2 представляет собой мембранный белок с мол. массой 26 000, локализованный на мембранах митохондрий, ядра и гранулярного эндоплазматического ретикулума.

Ген bcl-2 является протоонкогеном, однако повышение его экспрессии не приводит само по себе к злокачественному росту, так как, препятствуя апоптозу, он в противоположность другим онкогенам (например, c-myc) не влияет на пролиферативные функции клетки. Вначале было обнаружено, что перенос bcl-2 в незрелые пре-В-клетки, требующие для роста в культуре присутствия ИЛ-3, делает их ИЛ-3-независимыми и обеспечивает длительное выживание в среде, лишенной этого фактора роста. Далее было установлено, что Bcl-2 способен предотвращать гибель клеток путем апоптоза, индуцированную самыми разнообразными условиями и воздействиями: отсут-



Рис. 2.2. Модель активации каскада протеаз белками семейства Bcl-2.

ствие факторов роста, УФ- и γ -облучение, тепловой шок, химиотерапия, свободные радикалы и т.д. При этом, по-видимому, Bcl-2 блокирует общий конечный путь, приводящий к гибели клетки.

Биохимические механизмы действия белка Bcl-2 в настоящее время активно изучаются. С помощью молекулярных, биохимических и генетических методов недавно были обнаружены многочисленные гомологи данного белка. Эти белки не содержат последовательностей, характерных для ферментов или других белков с известными функциями. Среди этих гомологичных белков были выявлены стимуляторы апоптоза: белки Bax, Bak, Bcl-X_s. Обычно клетки, трансфицированные этими генами, жизнеспособны, но более чувствительны к стимулам, вызывающим апоптоз. Возможно, они супрессируют действие белка Bcl-2.

К настоящему времени показано, что белку Bcl-2 отводится ключевая роль в регуляции апоптоза, которая связана с влиянием на цитоплазматические протеазы класса ICE-подобных.

Модель действия белка Bcl-2 представлена на рис. 2.2. Установлено, что Bcl-2, Araf-1 (адапторный белок) и протеаза-1 способны образовывать единый комплекс на мембране митохондрий. Протеаза представлена в виде неактивного предшественника, активация которого происходит путем частичного протеолиза. При инициации апоптоза происходит высво-

бождение митохондриальных факторов, которые запускают апоптоз. Недавно установили, что таким фактором является цитохром c (ЦХс). Роль его в индукции апоптоза в настоящее время не вызывает сомнений. Высвобождение ЦХс происходит вследствие образования гетеродимерного комплекса между белками семейства Bcl-2 — ингибиторами и стимуляторами апоптоза. Обнаружено, что при поступлении цитотоксического сигнала происходит гетеродимеризация белков Bcl-2 и Bad, в результате чего высвобождается ЦХс из митохондрий в цитоплазму. Причина образования гетеродимера — дефосфорилирование Bad при поступлении сигнала индукции апоптоза. Каким образом ЦХс активирует протеазы, пока неизвестно. Роль белков Bcl-2 с другой субклеточной локализацией также не установлена.

Таким образом, роль белка Bcl-2 — основного регуляторного звена апоптоза нарушается при различных онкологических трансформациях. Как показано в следующих разделах, существенна роль этого белка при других патологиях, что свидетельствует о важной роли нормальной регуляции апоптоза в патогенезе ряда заболеваний.

2.2.2. МЕХАНИЗМЫ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ДНК

До последнего времени считалось, что нерепарируемые повреждения ДНК приводят клетку к гибели в результате нарушения функций всех биохимических систем вследствие невозможности полноценной транскрипции генов, содержащих дефекты в матрице ДНК. Исследования последних лет позволили сформировать принципиально новые представления о механизме гибели клеток, имеющих повреждения ДНК, как о процессе, осуществляемом в соответствии с определенной генетической программой. В индукции этой программы при наличии повреждений в ДНК клетки важная роль принадлежит белку p53. Этот белок с мол.массой 53 000 локализован в ядре клетки и является одним из транскрипционных факторов, повышенная экспрессия которого приводит к репрессии ряда генов, регулирующих транскрипцию и причастных к задержке клеток в фазе клеточного цикла G₁. При повреждении ДНК, ингибиторов топоизомеразы II и некоторых других воздействий происходит активация экспрессии гена p53. Блок клеточного цикла в фазах G₁ и G₂ до репликации ДНК и митоза соответственно делает возможной репарацию поврежденной ДНК и предотвращает тем самым появление мутантных и анеуплоид-

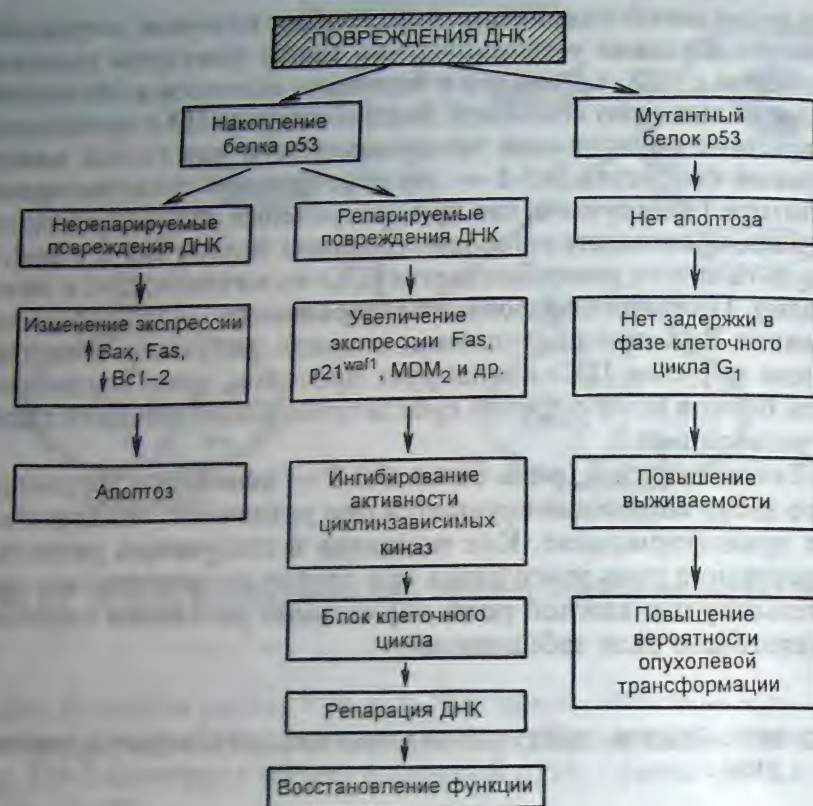


Рис. 2.3. Роль белка p53 в репарации ДНК и апоптозе при повреждениях ДНК.

ных клеток. Если активность репарационных систем недостаточна и повреждения ДНК сохраняются, то в таких клетках индуцируется запрограммированная клеточная гибель, или апоптоз. Гибель таких клеток защищает организм от наличия клеток с поврежденной ДНК, т.е. мутантных и способных к злокачественной трансформации.

Карбоксильный конец белка p53 может неспецифически связываться с концами молекул ДНК и катализировать ренатурацию и перенос нитей. На уровне транскрипции белок p53 трансктивирует гены, участвующие в блокаде клеточного цикла — p21^{wafl} (ингибитор большинства циклинзависимых киназ) и взаимодействует либо с комплексами, определяющими синтез и репарацию ДНК (PCNA, GADD 45 и p21^{wafl}), либо с белками, модулирующими апоптоз (Bax, Fas). Кроме перечисленных механизмов, белок p53 может ингибировать синтез ДНК по независимым от транскрипции механизмам, связываясь с ДНК и предотвращая инициацию репликации или образование репликационной вилки либо образуя комплексы бе-

лок — белок с белками, участвующими в синтезе ДНК, репарации ДНК и в апоптозе (рис. 2.3).

Мутации гена p53 позволяют клеткам с повреждениями ДНК сохранять жизнеспособность в митозе, что приводит к опухолевой трансформации. Действительно, при злокачественной трансформации обнаружено значительное количество мутаций гена p53.

Частота встречаемости мутаций гена p53 при онкологических заболеваниях

Локализация опухоли	Частота мутаций гена p53, %
Легкое	56
Кишечник	50
Желудок	41
Предстательная железа	30
Мозг	25
Почка	19
Семенники	0
Гипофиз	0

Мутации гена p53 обуславливают плохой прогноз при лечении больных со злокачественными новообразованиями. Такие опухолевые клетки оказываются резистентными к лучевой и химиотерапии, и, наоборот, опухоли с нормальным белком p53 легко поддаются лечению.

Таким образом, при действии генотоксических агентов белок p53 не только увеличивает время репарации ДНК, но также защищает организм от клеток с опасными мутациями.

Итак, блокирование процесса апоптоза, происходящее на разных стадиях канцерогенеза, снижает способность трансформированных клеток активировать программу клеточной гибели, что определяет прогрессию опухолевого заболевания.

2.3. АПОПТОЗ И ВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ

2.3.1. ВИРУСЫ, ИНИЦИИРУЮЩИЕ АПОПТОЗ КЛЕТОК

Феномен гибели клеток, инфицированных вирусами, известен давно, хорошо изучен и широко используется для количественной оценки цитопатического действия вирусов при оценке активности противовирусных препаратов. Однако только в последние годы было показано, что гибель инфици-

рованных клеток происходит в результате индукции вирусом специальной генетической программы, т.е. апоптоза. Гибель инфицированных вирусами клеток может рассматриваться как защитный механизм, предотвращающий распространение вирусов. Цитотоксические Т-лимфоциты также предотвращают распространение вирусов в результате узнавания и уничтожения клеток, содержащих вирусные пептиды, связанные с поверхностью клетки. В исследованиях, проведенных на культурах клеток, показано, что апоптоз в клетках-хозяевах индуцируют такие семейства вирусов, как вирусы герпеса, аденовирусы, поксовирусы, бакуловирусы, парвовирусы, ретовирусы, рабдовирусы, парамиксовирусы (кори), ортомиксовирусы (гриппа), тогавирусы, пикорнавирусы (полиомиелита).

Вирусиндуцируемый апоптоз характеризуется обычными для этого явления признаками, включая изменения морфологии ядра и клетки в целом и межнуклеосомную фрагментацию ДНК. Следует подчеркнуть, что инфицированные клетки, которые лизируются в процессе выхода вновь образованных вирусных частиц, погибают в результате некроза. Очень многие гены, продукты которых (белки) индуцируют или предотвращают гибель клеток, кодируются вирусами. С помощью таких белков вирусы регулируют функции клеток.

Основные вирусы, индуцирующие апоптоз

Вирусы	Функция вирусных белков — индукторов апоптоза
Аденовирус E1A	Индуктирует пролиферацию
Аденовирус E3/ADP	Разрушает ядра
Бакуловир E1E-1	Фактор транскрипции
Вирус анемии цыплят VP3/апоптин	Ядерный белок
Вирус иммунодефицита человека	Активация Т-клеток
Вирус иммунодефицита человека	Фактор транскрипции
Человеческий Т-лимфо- тропный вирус — Itax	Фактор транскрипции
Ретровирус 81	Капсидный белок связывается клеточной поверхностью
Сибисвирус E2	Трансмембранный гликопротеин

Индуктируемый вирусами апоптоз может быть ведущим механизмом в патогенезе вирусных заболеваний. Примером таких заболеваний является паралич лабораторных мышей при заражении нейротропным вирусом (Синдбис). Индукция этим

вирусом апоптоза нейронов головного и спинного мозга мышцей коррелировала со смертностью: нейровирулентные штаммы индуцировали *in vivo* более интенсивный апоптоз по сравнению с менее вирулентными.

Следует отметить также, что причиной индукции апоптоза клеток, зараженных вирусами, может быть действие цитотоксических лимфоцитов или природных киллеров (NK-клетки), так как известно, что NK и цитотоксические лимфоциты способны распознавать вируссодержащие клетки и развивать против них цитотоксический ответ.

Таким образом, вирусы могут индуцировать или блокировать апоптоз в зараженной клетке как за счет специфического действия продуктов вирусных генов, так и в результате изменения свойств поверхностной мембраны клетки, что делает ее мишенью для цитотоксических иммунокомпетентных клеток.

2.3.2. ВИРУСЫ, ИНГИБИРУЮЩИЕ АПОПТОЗ КЛЕТОК

Некоторые вирусы живут в апоптозных клетках. Это представляет определенную опасность для организма и имеет существенное значение в патогенезе заболевания. Объясняется это тем, что многие вирусы кодируют гены, ингибирующие апоптоз.

Вирусы, ингибирующие апоптоз

Вирусы	Функция вирусных белков — ингибиторов апоптоза
Аденовирус E1 B19K	Гомолог Bcl-2
Аденовирус E1 B55K	Связывает белок p53 и вызывает его деградацию
Вирус африканской лихорад- ки свиней (S-HL)	Гомолог Bcl-2
Бакуловир p35	Ингибитор каспаз
Вирус коровьей оспы SPI-2 (сгмА)	Серпин, ингибитор каспаз
Цитомегаловирус IE1 и IE2	Факторы транскрипции
Вирус Эпштейна — Барр HMRFI, BHRFI	Гомолог Bcl-2
Вирус герпеса ORF 16	Гомолог Bcl-2
Вирус герпеса человека 8, KS bcl-2	Гомолог Bcl-2
Поксовирус кролика SPI-1	Серпин, ингибитор каспаз

Способность ингибировать апоптоз позволяет вирусам закончить цикл репликации до гибели клетки. Ингибиторы апоптоза аденовирусов, кроме того, ускоряют трансформацию

клеток, блокируя апоптоз, индуцируемый трансформирующим геном E1A. Однако роль этого процесса (блока апоптоза) в злокачественном перерождении клетки еще не показана ни для одного из вирусов.

Анализ приведенных данных позволяет сделать заключение, что вирусы ингибируют апоптоз в основном с помощью гомологов Bcl-2 (структурных или функциональных) или с помощью ингибиторов каспаз.

2.4. НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ, НЕЙРОНЫ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА И АПОПТОЗ

В критической фазе развития нервной системы выделяют период естественной гибели клеток, в течение которого незрелые нейроны подвергаются активным процессам клеточной гибели, возможно, вследствие недостатка питательных веществ, получаемых от соседних клеток. Гибель нейронов в головном мозге взрослых организмов лежит в основе патологии многих нейродегенеративных заболеваний с широко варьирующими симптомами. Если гибель нейронов происходит в результате апоптоза, то возникает возможность поиска средств, блокирующих этот процесс, а следовательно, и средств излечения таких заболеваний. В связи с этим изучение механизмов индукции и регуляции апоптоза нейронов актуально. В нервной системе после завершения периода естественной гибели клеток апоптоз нейронов рассматривается как патология. Известно, что этот процесс приводит к клиническим проявлениям в виде таких заболеваний, как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Дауна, хорея Гентингтона. Апоптоз нейронов обнаружен и при ишемических поражениях головного мозга.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе ПГК нейронов, в настоящее время интенсивно изучаются. Можно предположить, что в индукции апоптоза нейронов важная роль принадлежит изменению состояния митохондрий под действием различных, в том числе генетических, факторов. Основанием для такого предположения являются данные о связи мутаций митохондриальной ДНК с заболеваниями в основном с нейрогенной симптоматикой. Уже известно, что диабет, глухота, врожденные кардиомиопатии и ряд других заболеваний, по-видимому, могут быть связаны с мутациями в ДНК митохондрий. Кроме того, мутации ДНК могут влиять на развитие ряда болезней, вызванных другими причинами: болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона.

Важно подчеркнуть, что повреждение клеток головного

мозга, выполняющих трофические функции, может приводить к поражению нейронов в результате снижения концентрации или отсутствия необходимых факторов роста типа ФРН.

В настоящее время разработаны методы, позволяющие адекватно оценивать наличие апоптоза не только в культуре клеток, но и в отдельных органах и тканях организма. Особо следует подчеркнуть, что разработаны методы, сочетающие биохимические и гистологические подходы и позволяющие исследовать процессы апоптоза на гистологических срезах, в том числе при использовании срезов, приготовленных из патологоанатомического материала в виде парафиновых блоков, что делает возможным ретроспективное исследование богатого материала патологоанатомических архивов.

Основные представления о роли определенных генов в апоптозе нейронов получены в экспериментах на культурах клеток при введении в клетки ДНК в виде отдельных генов с помощью микроинъекций. В этих исследованиях было показано, что введение генов bcl-2, bcl-X_L и c-mA защищало нейроны от развития апоптоза, а гены bax, bak его индуцировали. Показано, что ген bcl-2 защищает нейроны и при различных патологических воздействиях в эксперименте, в том числе и при окклюзии центральной церебральной артерии, моделирующей инсульт. В последнем случае у трансгенных по bcl-2 животных зона ишемии была на 40 % меньше, чем у контрольных. Роль апоптоза в гибели нейронов при ишемии убедительно продемонстрирована в экспериментах: выявлялась фрагментация ДНК головного мозга после ишемического инсульта.

Таким образом, апоптоз как физиологическое явление поддерживает гомеостаз, сохраняя баланс между быстрым ростом и гибелью нейронов путем устранения клеток, не достигших стадии дифференциации, имеющих дефект развития или значительные повреждения.

Следовательно, патогенез заболеваний связан с нарушением ключевых регуляторных моментов апоптоза. Исследование взаимосвязи этих процессов, идентификация морфологических и биохимических маркеров апоптоза должны в перспективе способствовать более глубокому пониманию механизмов патогенеза заболеваний, улучшению дифференциальной диагностики и созданию принципиально нового направления в терапии.

2.5. ПРИНЦИПЫ КОРРЕКЦИИ АПОПТОЗА КЛЕТКИ

Открытие регулируемого процесса гибели клетки — апоптоза — позволило определенным образом воздействовать на

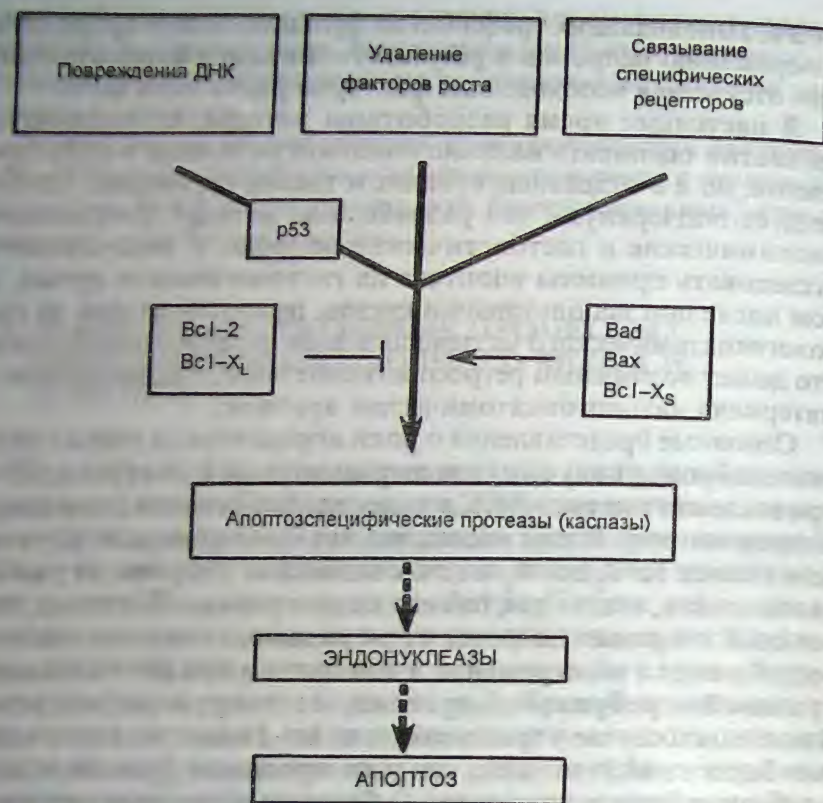


Рис. 2.4. Последовательность биохимических процессов при индукции апоптоза.

его отдельные этапы с целью регуляции или коррекции. Биохимические процессы развития апоптоза можно гипотетически разделить на несколько этапов, включающих действие фактора, вызывающего апоптоз; передачу сигнала с рецепторной молекулы в клеточное ядро; активацию апоптоспецифических генов; синтез апоптоспецифических белков и заключительную, определяющую стадию — регулируемые активацию эндонуклеаз и фрагментацию ДНК (рис. 2.4).

В настоящее время считают, что если клетка погибает путем апоптоза, то подразумевается возможность терапевтического вмешательства, если вследствие некроза, то такое вмешательство невозможно. На основе знаний регуляции запрограммированной гибели клетки используется широкий ряд препаратов с целью воздействия на этот процесс в различных типах клеток. Так, сведения о рецепторопосредованной регуляции апоптоза клеток учитывают при лечении гормонзависимых опухолей. Андрогенблокирующую терапию назначают при раке предстательной железы. Рак молочной железы часто под-

вергается регрессии при использовании антагонистов эстрогеновых рецепторов. Информация о биохимических сигнальных путях регуляции апоптоза позволяет эффективно применять антиоксидантную терапию, препараты, регулирующие концентрацию кальция, активаторы или ингибиторы различных протеинкиназ и т.д. с целью коррекции апоптоза в различных типах клеток.

Осознание роли апоптоза в гибели клеток интенсифицировало поиск фармакологических воздействий, защищающих клетки от апоптоза. Активно изучаются ингибиторы специфических протеаз в качестве фармакологических агентов. Это, как правило, три- или тетрапептиды, содержащие аспарагиновую кислоту (Асп). Использование таких протеаз в терапевтических целях ограничено их низкой способностью проникать в клетку. Однако, несмотря на это, в экспериментах *in vivo* успешно применяется Z-VAD-FMK [N-бензилоксикарбонил-Вал-Ала-Асп(ОМе)-фторметилкетон] — ингибитор ICE-подобных протеаз широкого спектра действия для снижения зоны инфаркта при моделировании инсульта. В ближайшие годы можно ожидать появления новых лекарственных средств для лечения и предупреждения различных заболеваний, основу действия которых будет составлять принцип регуляции процессов апоптоза.

Наиболее эффективны для коррекции апоптоза подходы, связанные с регуляцией апоптоспецифических генов. Эти подходы лежат в основе генной терапии — одного из перспективных направлений лечения больных с заболеваниями, вызванными нарушением функционирования отдельных генов.

Принципы генной терапии включают следующие этапы:

- идентификация последовательности ДНК, которая будет подвергаться лечению;
- определение типа клеток, в которых будет проводиться лечение;
- защита ДНК от гидролиза эндонуклеазами;
- транспорт ДНК в клетку (ядро).

Генно-терапевтические подходы позволяют как усиливать работу отдельных генов (трансформация генов, ингибирующих апоптоз, например гена *bcl-2*), так и ослаблять их экспрессию. Для селективного ингибирования экспрессии генов в настоящее время используют технику антисмысловых олигонуклеотидов (антисенсов). Использование антисенсов снижает синтез определенных белков, что влияет на регуляцию процесса апоптоза.

Механизм действия антисенсов активно изучается. В некоторых случаях короткие (13—17 оснований) антисмысловые

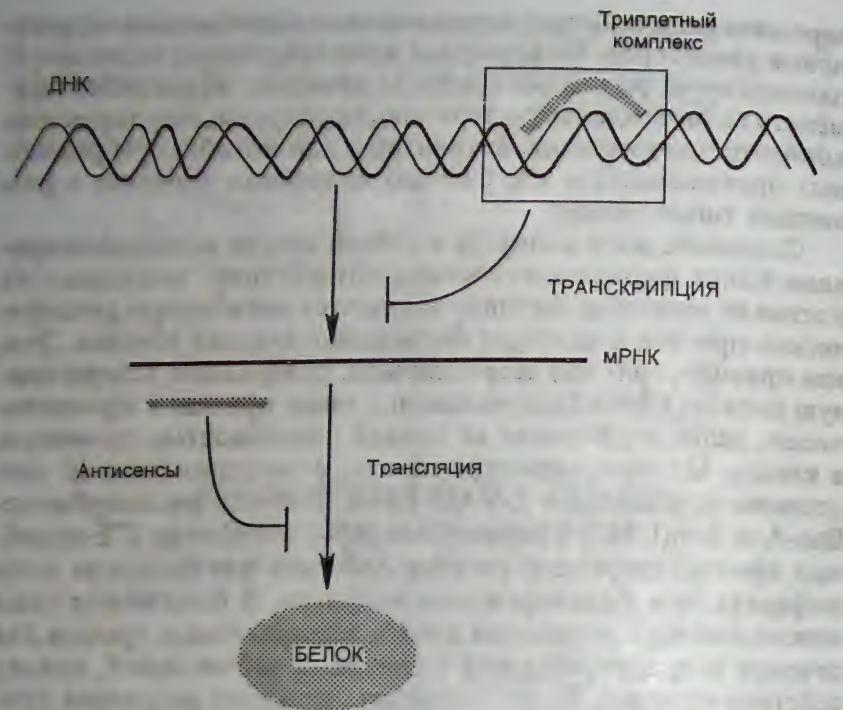


Рис. 2.5. Регуляция экспрессии генов антисмысловыми олигонуклеотидами.

олигонуклеотиды, имеющие последовательности, комплементарные нуклеотидным последовательностям матричной РНК (мРНК) отдельных белков, могут эффективно блокировать генетическую информацию на стадии, предшествующей транскрипции (рис. 2.5). Данные олигонуклеотиды, связываясь с ДНК, формируют триплетную спиральную структуру. Такое связывание может быть необратимым или вызывать селективное выщепление триплетного комплекса, что в итоге приводит к ингибированию экспрессии гена и гибели клетки. В других случаях происходит комплементарное связывание антисенса с мРНК, что вызывает нарушение трансляции и снижение концентрации соответствующего белка.

В настоящее время убедительно показано, что технология с использованием антисенсов имеет большое значение для регуляции отдельных генов в культуре клеток. Успешное подавление гена bcl-2 в экспериментах на культурах клеток пробуждает надежду на применение в будущем антисенсов для лечения больных раком. Во многих экспериментах *in vitro* показано, что антисенсы вызывают ингибирование пролиферации и дифференцировки клеток. Такой результат подтверждает перспективы терапевтического использования данной технологии.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ

1. Основная цель запрограммированной гибели клеток — поддержание постоянства количества и качества клеток организма. Учитывая целесообразность процесса апоптоза, сделайте предположение о происхождении апоптоза в ходе эволюционного развития.

2. При длительной кортикостероидной терапии (например, кортизолом или его аналогами) наблюдается атрофия коркового слоя надпочечников. Установлено, что гибель клеток происходит путем апоптоза. Выработка гормонов контролируется корой надпочечников центральной нервной системы. Восстановите последовательность развития апоптоза клеток коркового слоя надпочечников у больных.

3. При злокачественных опухолях желудка и кишечника обнаружена мутация в гене, кодирующем белок Вах. Какова последовательность событий, приводящих к нарушению регуляции апоптоза в этих клетках?

4. При онкологических заболеваниях выявлены мутации в гене p53, что приводит к нарушению регуляции апоптоза. На основе механизма индукции апоптоза белком p53 предположите, какой из подходов терапии опухолевых заболеваний будет неэффективным для больных?

5. При апоптозе клетки происходит инвертирование молекулы фосфатидилсерина из внутреннего билипидного слоя плазматической мембраны в наружный. Вспомните строение молекулы фосфатидилсерина. Как изменяются свойства плазматической мембраны апоптозной клетки? Сделайте предположение о целесообразности этого процесса.

6. Какова роль вирусов в развитии заболеваний с точки зрения регуляции апоптоза клеток?

7. Внутриклеточными посредниками в передаче рецепторопосредованного сигнала апоптоза являются cAMP, ионы Ca^{2+} , активные формы кислорода и т.д. Каким образом можно исследовать роль отдельных посредников в передаче сигнала индукции апоптоза?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лушников Е.Ф., Загребин В.М. Апоптоз клеток: морфология, биологическая роль, механизмы развития//Арх. пат. — 1987. — Т. 49. — С. 84—89.
2. Программированная клеточная гибель/Под ред. В.С.Новикова. — СПб.: Наука, 1996.
3. Скулачев В.П. В своем межмембранном пространстве митохондрия таит «белок самоубийства», который, выйдя в цитозоль, вызывает апоптоз//Биохимия. — 1996. — Т. 61. — С. 2060—2063.
4. Уманский С.Р. Апоптоз: молекулярные и клеточные механизмы//Молекулярная биология. — 1996. — Т. 30, вып. 3. — С. 487—502.
5. Ярилин А.А. Апоптоз и его место в иммунных процессах//Иммунология. — 1996. — Т. 6. — С. 10—23.

6. *Arends M.J., Wyllie A.H.* Apoptosis. Mechanism and role in pathology//Int. Rev. Exp. Pathol. — 1991. — Vol. 32. — P. 223-254.
7. *Golstein P.* Controlling cell death//Science. — 1997. — Vol. 275. — P. 1081—1082.
8. *Hardwick J.M.* Virus-induced apoptosis//Adv. Pharmacol. — 1997. — Vol. 41. — P. 295—336.
9. *Harris C.C.* Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies//J. natl. Cancer Inst. — 1996. — Vol. 88. — P. 1442—1454.
10. *Hug H.* Fas-mediated apoptosis in tumor formation and defense//Biol. Chem. — 1997. — Vol. 378. — P. 1405—1412.
11. *Jacobson D.* Bcl-2 — related proteins get connected//Current Biology. — 1997. — Vol. 7. — P. 277—281.
12. *Kroemer G.* The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis//Nature Medicine. — 1997. — Vol. 3. — P. 614—620.
13. *Magno G., Joris I.* Apoptosis, oncosis, necrosis//Amer. J. Path. — 1995. — Vol. 146, N 1. — P. 3—15.
14. *Nishimoto J., Okamoto T., Gramorella U., Iwatsubo T.* Apoptosis in neurodegenerative disease//Adv. Pharmacol. — 1997. — Vol. 41. — P. 337—369.
15. *Pan H., Yin C., Dyke T.V.* Apoptosis and cancer mechanisms//Cancer Surveys. — 1997. — Vol. 29. — P. 305—327.
16. *Shugar D.* Perspectives in antisense Therapeutics//Pharmacol. Ther. — 1997. — Vol. 76. — P. 151—160.
17. *Vaux D.L., Strasser A.* The molecular biology of apoptosis//Proc. natl. Acad. Sci. — 1996. — Vol. 93. — P. 2239—2244.
18. *Wallach D.* Placing death under control//Nature. — 1997. — Vol. 388. — P. 123—126.

Глава 3 | МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ОНКОГЕНЕЗА

В организме человека 10^{15} клеток. В течение жизни происходит их обновление в объеме, равном 10 объемам человеческого тела. Из этого становится понятным, что только тонкая сбалансированность процессов пролиферации, дифференцировки и апоптоза позволяет поддерживать нормальное развитие и функционирование всех органов и тканей. Пролiferация обеспечивает воспроизведение клеток, дифференцировка — приобретение ими индивидуальных черт и способности к специализированным видам деятельности, а апоптоз — разрушение старых и поврежденных клеток.

Рак представляет собой совокупность генных болезней, характеризующихся неконтролируемой клеточной пролиферацией.

В настоящее время доказано, что нарушения, ответственные за развитие опухолей, происходят на уровне ДНК. За исключением вирусиндуцированных неоплазм, которые у людей достаточно редки, трансформация клеток является результатом структурных изменений в специфических генах, кодирующих белки, принимающие участие в регуляции роста, деления и гибели клеток.

Как причина смерти населения рак занимает второе место после сердечно-сосудистых болезней. Существует более 100 видов рака, хотя пять из них: рак легкого, молочной железы, толстой кишки, предстательной железы и матки — составляют более 50 % от всех впервые диагностируемых случаев.

В зависимости от способности к распространению опухоли делят на доброкачественные, или локальные, не обладающие способностью прорастать в соседние ткани, и злокачественные, способные к инвазии и метастазированию в другие органы.

Канцерогенез — комплексный многоступенчатый процесс, включающий изменения не менее чем в 6—10 генетических факторах, каждый из которых является скоростным лимитирующим. В организме носителя каждая стадия процесса представляет собой физиологический барьер, который должен быть преодолен клеткой, прогрессирующей в сторону малигнизации (злокачественная трансформация). Существование множественности барьеров указывает на то, что малигнизация — явление редкое.

3.1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Опухолевые клетки, как правило, округлые или звездчатые, они крупнее нормальных; отличаются многообразием ядерных и клеточных форм. В них изменено ядерно-цитоплазматическое соотношение, для них характерна полиплоидия (состояние, при котором ядро содержит три и большее число гаплоидных наборов хромосом) или анеуплоидия (число хромосом изменяется и становится не кратным гаплоидному набору). Трансформированные клетки могут расти, не прикрепляясь к поверхности, в них снижена способность к адгезии, при этом теряет силу контактное торможение. В опытах *in vitro* они растут, наполняя друг на друга и образуя мультислой, в которых велико содержание митотических клеток.

В метаболизме опухолевых клеток обнаруживается ряд характерных особенностей, которые существенно отличают их от нормальных. Так, в опухолевых клетках происходит следующее:

- возрастает активность рибонуклеотидредуктазы и снижается катаболизм пиримидинов, увеличивается синтез ДНК и РНК;
- повышается скорость гликолиза как аэробного, так и анаэробного, и увеличивается продукция лактата. Характерная для многих опухолей повышенная секреция лактата получила название *эффекта Варбурга*. Преимущественный анаэробный гликолиз, по-видимому, является не внутренне присущим опухолевым клеткам свойством, а скорее следствием быстрого роста при слабой обеспеченности сетью кровеносных сосудов. Установлено, что чем менее дифференцирована опухоль и чем выше скорость ее роста, тем интенсивнее протекает в ней анаэробный гликолиз и слабее окислительное фосфорилирование;
- возрастает содержание фетальных форм в изоферментном спектре различных белков и ферментов. Так, в углеводном обмене — это фосфофруктокиназа, не ингибирующаяся АТФ и цитратом, изофермент III гексокиназы, характеризующийся чрезвычайно высоким сродством к глюкозе, и очень активная лактатдегидрогеназа. В результате раковая клетка приобретает чрезвычайно высокое сродство к глюкозе и способность ассимилировать ее даже при очень низких концентрациях в крови. Аналогичные сдвиги в спектре изоферментов наблюдаются и в других обменах. Это позволяет опухолевым клеткам успешно конкурировать с окружающими тканями за жизненно важные метаболиты. Появляются новые эмбриональные белки и

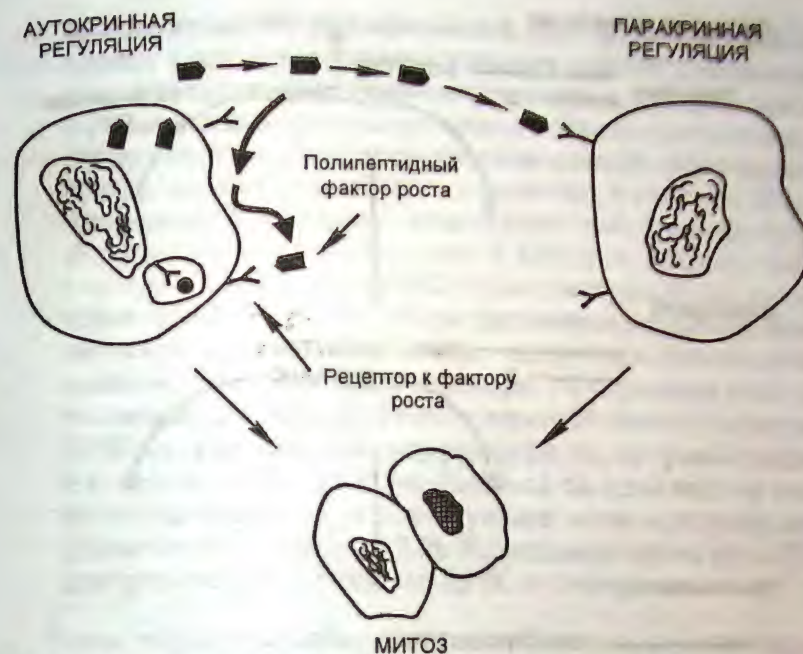


Рис. 3.1. Регуляция пролиферации опухолевых клеток.

антигены, такие, как α -фетопротеин, карциноэмбриональный антиген и многие другие;

- изменяются состав и структура олигосахаридных цепей: гликопротеинов и гликосфинголипидов плазматической мембраны, а как следствие ее проницаемость и заряд. В частности, наблюдается изменение уровня синтеза и строения адгезивных молекул, а также интегриновых рецепторов, входящих в состав белков мембран опухолевых клеток;
- секретируются некоторые металлопротеазы, коллагеназы, способствующие инвазии опухоли в соседние ткани и сосуды, факторы ангиогенеза, стимулирующие развитие сосудов, которые должны снабжать раковые клетки питательными веществами. Изменения стимулируют различные факторы роста: например, фактор роста фибробластов усиливает пролиферацию эндотелиальных клеток;
- возрастает скорость синтеза и секреции гормонов и некоторых факторов роста (например, секреция тканью рака легкого АКТГ или, реже, инсулина и глюкагона). Опухоли приобретают способность к автономному росту за счет перехода на пара- или аутокринный механизмы регуляции клеточного роста (рис.3.1). При аутокринном механизме опухоли синтезируют факторы роста (ФР)

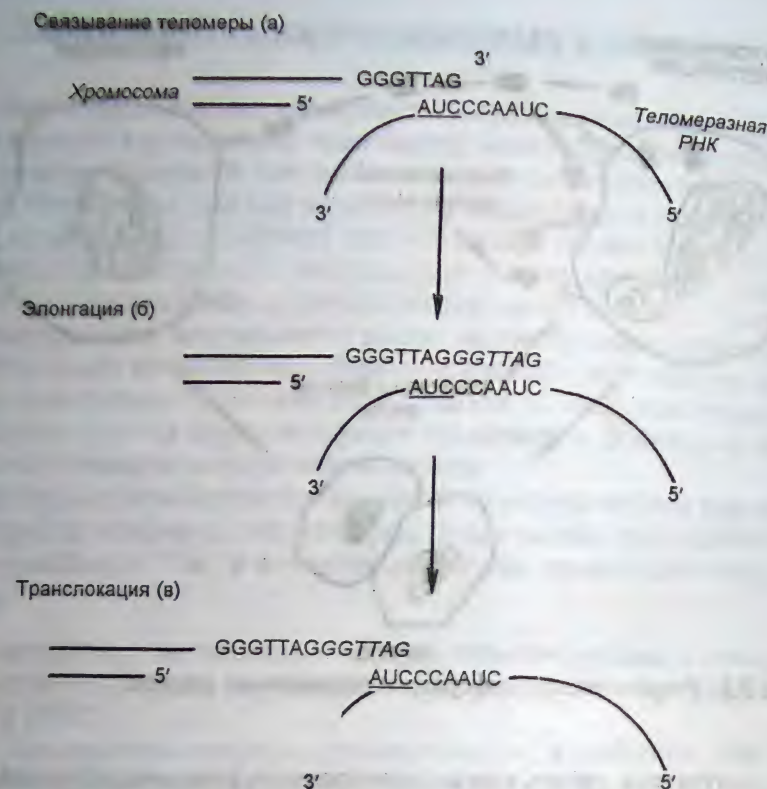


Рис. 3.2. Механизм удлинения концов эукариотических хромосом. Объяснение в тексте.

и рецепторы к ним (рФР) или онкобелки, являющиеся аналогами ФР или рФР. Образованные одной и той же клеткой ФР и соответствующие им рецепторы, взаимодействуя между собой, вызывают аутоstimуляцию роста и деления клеток. Паракринная регуляция предполагает взаимодействие ФР, вырабатываемых одними клетками, с рФР, расположенными на соседних клетках. Так, при раке легкого клетки стромы вырабатывают инсулиноподобный фактор 2, который взаимодействует с рецепторами ткани рака и стимулирует ее рост и деление;

- появляется высокоактивный фермент теломераза или альтернативные пути удлинения теломер. У животных и человека на концах линейных хромосом расположены тысячи высококонсервативных повторов гексadesоксинуклеотидов TTAGGG, называемых теломерами, которые позволяют концам хромосом прикрепляться к ядерной оболочке и предотвращают их деградацию и рекомбинации. При каждой репликации длина теломер укорачивается

примерно на 100 пар оснований. Для делящихся соматических клеток укорочение теломер служит репликометром, определяющим количество делений, которое способно совершить нормальная клетка. После достижения теломерными последовательностями критического размера клетки теряют способность к делению и стареют (*барьер Хейфлика*). Теломераза представляет собой олигомерный фермент рибонуклеопротеин, в котором специфический участок теломеразной РНК служит матрицей для синтеза теломерной ДНК. Механизм удлинения концов эукариотической хромосомы включает следующие этапы: а) связывание G-богатой цепи теломеры с матричным участком теломеразной РНК; б) РНК-зависимый синтез теломерной ДНК из дезоксинуклеозидтрифосфатов; в) транслокацию, т.е. перемещение ДНК, удлиненной на один повтор относительно фермента, и последующее многократное повторение этих стадий (рис. 3.2). Комплементарная нить ДНК достраивается с помощью ДНК-полимеразы.

Таким образом, особенности метаболизма, существование эффективного механизма удлинения теломер и способность к автономному росту дают опухоли не только преимущества в росте и размножении, но ведут к появлению клонов иммортализованных, или бессмертных, клеток.

3.2. ИНВАЗИЯ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ

Обычно неоплазмы возникают из одной аномально пролиферирующей клетки. В процессе опухолевой прогрессии нарушается стабильность генома и потомки одной клетки начинают «расходиться» как генетически, так и фенотипически. Анеуплоидия, мутации, транслокации приводят к тому, что в составе опухоли возникает множество клонов, различающихся по своим биологическим свойствам. Формируются клетки, способные к метастазированию, т.е. обладающие свойствами прорасти в соседние ткани, с лимфой и кровью переноситься в другие органы и давать начало вторичным опухолям. Эта стадия опухолевого процесса возникает вследствие существенного перепрограммирования генной активности клеток и конкуренции клонов, ведущих к все более злокачественному фенотипу. В плазматических мембранах при этом снижается концентрация некоторых адгезивных молекул: Е-кадгерина, катенинов и интегринов, что обеспечивает подвижность опухолевых клеток и их контакт с белками межклеточного матрикса: ламинином, фибронектином и коллагеном. Внутренняя орга-

низация клеток меняется и они приспособляются к перемещению. Включается синтез ряда гидролитических ферментов: коллагеназ, гепараназы, катепсина В и плазмина, которые разрушают белки и протеогликаны межклеточного матрикса и базальной мембраны и позволяют опухолевым клеткам активно проникать в кровеносные сосуды и тканевые структуры.

Мощная протеаза катепсин В в трансформированных клетках располагается не в лизосомах, как во всех нормальных клетках, а в плазматической мембране и помогает этим трансформированным клеткам покинуть родительскую ткань. Существенную роль в малигнизации клеток и их метастазировании играет семейство металлопротеиназ, отдельные представители которого экспрессируются в разные периоды развития неоплазм и участвуют в деградации компонентов межклеточного матрикса.

К факторам, способствующим движению метастазирующих клеток по сосудистому руслу, относятся белковые миграционные факторы, тромбоциты и фрагменты межклеточного матрикса, которые, образуя надмолекулярные комплексы с клетками опухоли, обеспечивают транспорт и прикрепление к базальной мембране в органах-мишенях. Однако лишь одна из 10 000 метастазирующих клеток достигает места новой локализации, большинство разрушается в кровотоке макрофагами и природными клетками-киллерами, или NK-клетками (natural killer-cells).

Для большинства опухолей характерна определенная тропность процесса: метастазы появляются не в любых, а в «излюбленных» данной формой местах. Так, рак предстательной железы, как правило, дает метастазы в кости, рак молочной железы и легкого — в мозг, а рак прямой кишки — в печень. Выбор органа-мишени обусловлен специфическим взаимодействием углеводных компонентов плазматической мембраны опухолевой клетки со структурами олиго- и полисахаридов, находящимися на поверхности эндотелиальных клеток. Однако взаимодействия между углеводами слабы, и клетка окончательно прикрепляется к стенке сосуда за счет связей, образованных интегринами.

3.3. ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ВЕЩЕСТВ В ОРГАНИЗМЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Опухоль, развивающаяся в организме человека, оказывает постоянное и по мере прогрессирования все более усиливающееся воздействие на обмен веществ, вызывая в итоге нарушения гомеостаза, не совместимые с жизнью.

На относительно ранних этапах опухолевого роста происходит, как считают некоторые авторы, анемизация организма, т.е. недостаточное снабжение тканей кислородом. Этим объясняется повышенный расход глюкозы, а как следствие этого — стимуляция фосфолиза гликогена в печени, увеличение глюконеогенеза, мобилизация триацилглицеринов (TAG) и образование кетоновых тел. Повышение концентрации липидов в крови ухудшает вязкостные свойства крови и еще больше увеличивает дефицит кислорода. В организме больного развивается также дефицит витаминов, в частности С и Е, являющихся антиоксидантами и снижающими явления перекисного окисления липидов (ПОЛ). Рост опухоли сопровождается увеличением содержания продуктов ПОЛ и повреждением структуры мембран.

Развитие рака и возникающие при этом гипоксия и самоподкисление опухоли изменяют функционирование эндокринной системы: способствуют возникновению резистентности к инсулину и реактивной гиперинсулинемии, гиперпродукции АКТГ, пролактина, тиреотропина и глюкокортикоидов. Последние, стимулируя глюконеогенез из тканевых белков, неблагоприятно воздействуют на клетки иммунной системы, вызывая их деструкцию по механизму апоптоза, что приводит к стойкой иммуносупрессии. В период максимального роста опухоли в тимocyтах и Т-лимфоцитах селезенки ингибируется синтез ДНК на уровне синтеза предшественников — дезоксирибонуклеозидтрифосфатов.

В центре неоплазмы часто возникают участки некроза, продукты которого всасываются в кровь и разносятся по организму, вызывая повышение температуры тела и другие проявления общей интоксикации.

3.4. ФАКТОРЫ, СТИМУЛИРУЮЩИЕ КАНЦЕРОГЕНЕЗ

Около 80 % случаев рака у людей являются результатом воздействия факторов окружающей среды, под которыми понимают стиль жизни (курение, производственные контакты с канцерогенами), пищевые продукты (зерновые, зараженные плесенью *Aspergillus flavus*, пищевые добавки, содержащие нитриты и вторичные амины), заболевания, увеличивающие риск развития опухолей: так, цирроз печени в ряде случаев ведет к развитию гепатоцеллюлярной карциномы, а язвенный колит — аденокарциномы толстой кишки и т.д. Склонность к опухолеобразованию может стимулироваться возрастом и наследственными изменениями генома. Например, предрасположенность к ретинобластому или множественному полипозу

толстой кишки наследуется как аутосомно-доминантный признак, а нестабильность хромосомной ДНК — как аутосомно-рецессивный.

Физические, химические и биологические воздействия, вызывающие трансформацию клеток, называют *канцерогенными воздействиями*. К ним относят:

- рентгеновские, γ - и УФ-лучи, которые оказывают как прямой повреждающий эффект на структуру ДНК за счет появления разрывов в нитях и нарушений в структуре азотистых оснований, так и не прямой, вызванный действием на макромолекулы свободнорадикальных форм кислорода, образующихся в тканях под воздействием облучения;
- химические вещества: полициклические ароматические углеводороды [бензо(а)пирен, диметилбензантрацен и др.], ароматические амины и аминокислоты (2-нафтил-амин, 2-ацетиламинофлуорен), нитрозамины и амиды, афлотоксины, некоторые лекарственные препараты, являющиеся алкилирующими или ацилирующими агентами: циклофосфамид, бисульфамид, диэтилстильбэстрол и др. Большинство из указанных соединений сами по себе не являются канцерогенами, но превращаются в них, подвергаясь в печени воздействию ферментов универсальной системы детоксикации ксенобиотиков (рис. 3.3). Образуются эпоксиды, свободные радикалы, ионы карбония или катионы, активные электрофильные группы которых взаимодействуют с нуклеофильными центрами в молекулах ДНК, РНК или белков, нарушают функционирование генетического материала и вызывают возникновение неоплазм;
- ДНК- и РНК-содержащие вирусы, которые встраиваются в клеточный геном и экспрессируют гены и белковые продукты, вызывающие неопластическую трансформацию. Такие гены стали называть *онкогенами*.

Данные о роли вирусов в развитии опухолей были получены в начале XX столетия. Так, в 1908 г. V. Ellerman и O. Bang вызвали лейкоз у кур воздействием бесклеточного экстракта из опухолевых клеток, а в 1910 г. R. Rous описал первый онкогенный вирус, способный инициировать саркому у кур. В 1968 г. Л. А. Зильбер сформулировал вирусно-генетическую теорию возникновения неоплазм под действием онкогенных вирусов. Вирусный канцерогенез первоначально был описан только у птиц и животных. В последнее время получены данные об участии вирусов в развитии некоторых опухолей у че-

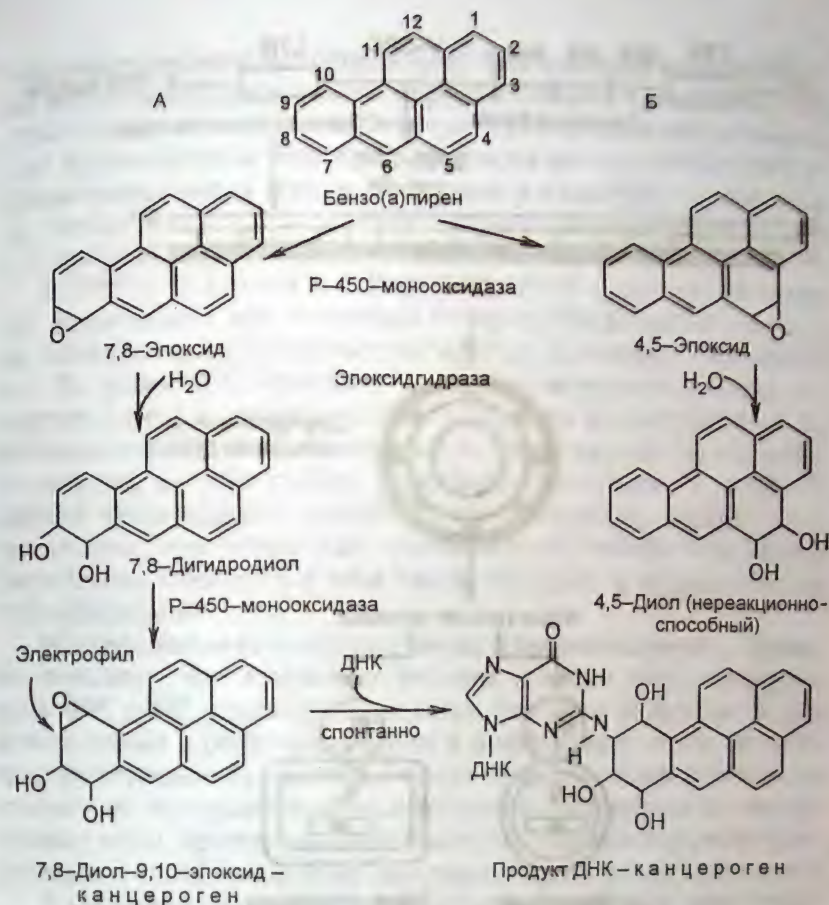


Рис. 3.3. Образование канцерогенов при воздействии ферментов детоксикации ксенобиотиков.

А и Б — два разных метаболических пути, по которым может превращаться бензо(а)пирен. Путь Б приводит к образованию неактивного продукта, а путь А — превращение бензо(а)пирена в канцероген, способный связываться с остатками гуанина в молекуле ДНК.

ловека: ДНК-содержащего вируса Эпштейна — Барр в развитии лимфомы Беркитта и назофарингеальной карциномы, ДНК папилломавируса — рака кожи и гениталий; РНК-содержащих вирусов: иммунодефицита человека HIV в возникновении сарком, Т-клеточного лимфотропного вируса HTLV1 как причины некоторых видов Т-клеточных лимфом и лейкозов и др.

ДНК-содержащие вирусы частично или полностью встраиваются в клеточный геном человека, экспрессируют вирусные гены и образующиеся белки в ядре, нарушают реализацию клеточной программы. Так, Т-антиген вирусов SV40 и полиомы, Е7 вируса папилломы человека связываются и инак-

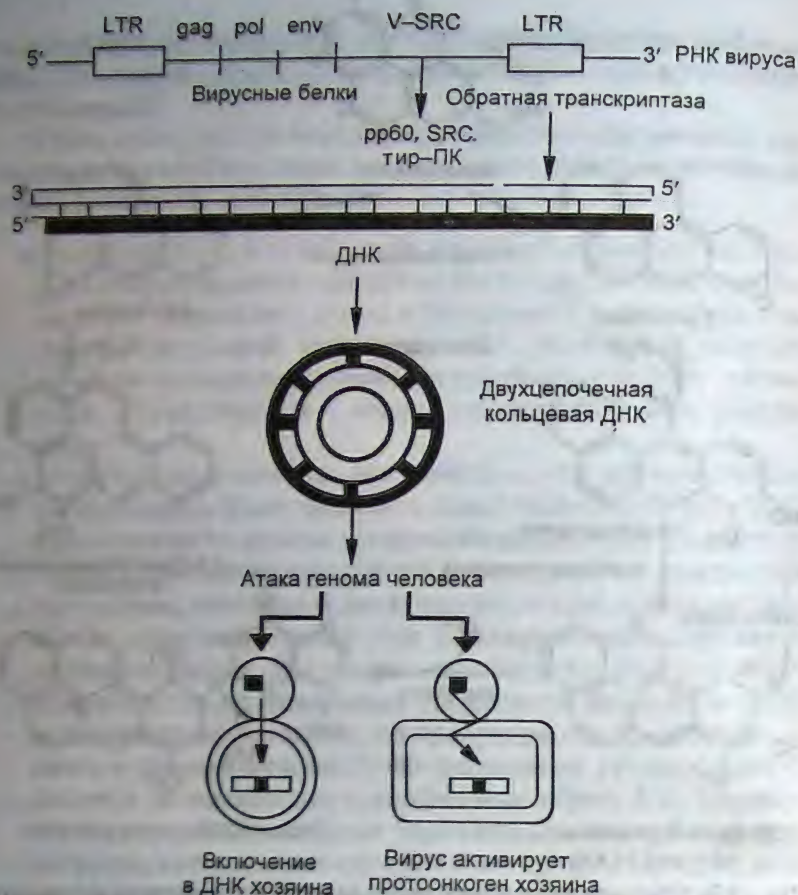


Рис. 3.4. Включение в геном человека генетического материала РНК-содержащего вируса.

вируют белки-репрессоры опухолей Rb и/или P53. К ДНК-онковирусам относят также вирус герпеса, аденовирус, папавирус, вирус ветряной оспы. Как правило, эти вирусы вызывают инфекционные болезни и лишь в одном из миллиона случаев — злокачественную трансформацию. ДНК-содержащий вирус гепатита В является причиной рака печени, от которого в мире умирает ежегодно около 500 000 человек, хотя и в этом случае инфицирование, как правило, происходит за 20—25 лет до возникновения опухоли.

РНК-онковирусы являются ретровирусами. Попадая в клетки человека, они синтезируют ДНК с помощью обратной транскриптазы и включают ее в эукариотический геном в виде провируса. В 1976 г. при помощи техники рекомбинантных ДНК в ретровирусе саркомы Рауса была расшифрована струк-

тура генетического материала (рис. 3.4) и наряду с тремя обычно встречающимися у всех вирусов генами обнаружен ген, ответственный за злокачественную трансформацию и названный src-онкогеном. Показано, что если src-ген встраивается в геном нормальных клеток, растущих в культуре, то они теряют способность к контактному торможению и приобретают все свойства трансформированных клеток.

В 1989 г. Д.Бишоп и Г.Вармус на РНК-содержащих вирусах установили, что онкогены не присущи вирусам исходно, но заимствованы из генома тех клеток, в которых они обитают. За время существования в составе вирусного генома они подвергаются многочисленным мутациям и приобретают онкогенные свойства. В некоторых случаях вирусы не содержат онкогенов, но достаточно случайного внедрения в геном человека чужеродного генетического материала, содержащего энхансеры, или усилители транскрипции, чтобы поменялась экспрессия соседних с ним генов хозяина и произошла их трансформация.

Исследования структуры генома млекопитающих и человека показали, что в эукариотических клетках гены, кодирующие ФР, рФР, транскрипционные факторы и другие белки, вовлеченные в регуляцию роста и дифференцировки, являются структурными аналогами онкогенов, т.е. теми исходными генами, из которых онкогены возникли. Эти нормальные клеточные гены, прототипы онкогенов, не обладают трансформирующими свойствами и их называют протоонкогенами.

В настоящее время изучены десятки вирусных онкогенов, из которых более 50 % кодируют в клетках тирозиновые протеинкиназы (тир-ПК), а остальные содержат информацию о различных функционально активных белках: укороченном факторе роста тромбоцитов (ФРТ), укороченном рецепторе эпидермального фактора роста (рЭФР), ДНК-связывающих, ГТФ-связывающих и некоторых других регуляторных белках.

3.5. МЕХАНИЗМЫ НЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Вирусные онкогены ответственны за очень небольшую часть неоплазм человека, поэтому внимание молекулярных онкологов главным образом сосредоточено на клеточных онкогенах. Последние возникают в результате точечных мутаций в кодирующих и регуляторных областях протоонкогенов, их амплификации (увеличение числа копий) и активации под влиянием экзогенных промоторов, утраты отдельных аллелей и генных локусов при делециях и хромосомных перестройках,

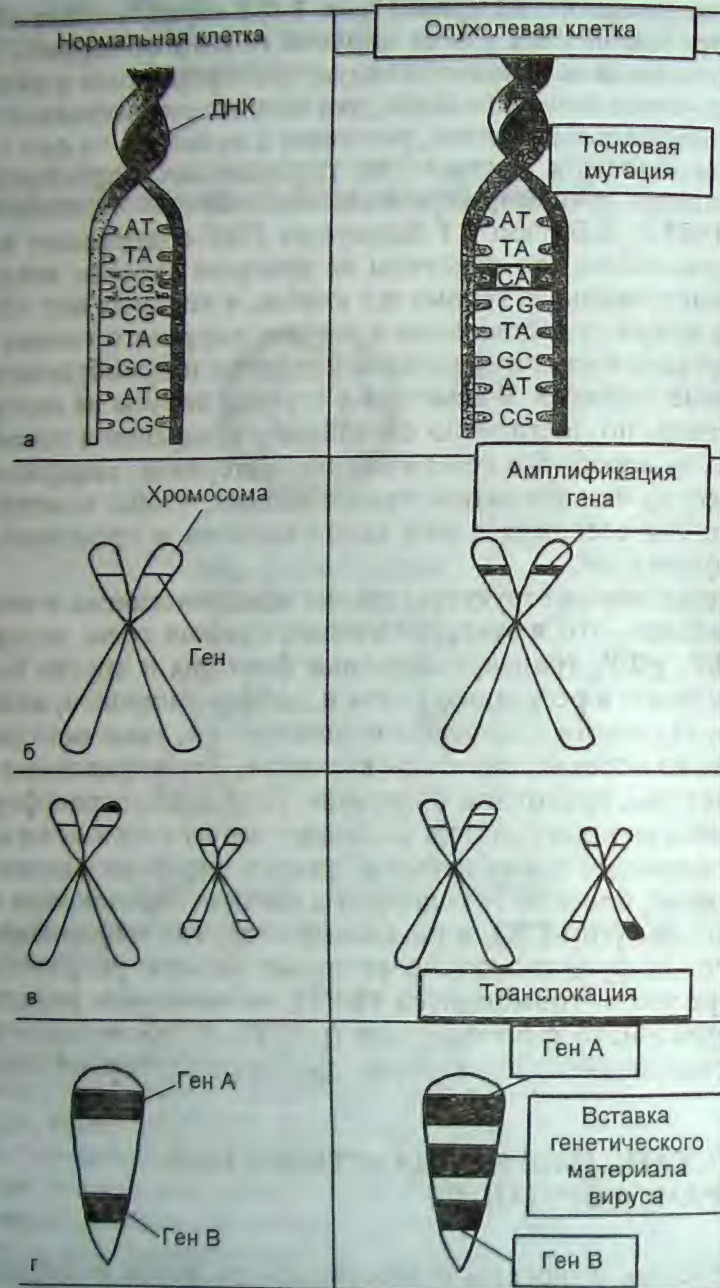


Рис. 3.5. Генетические нарушения в структуре хромосом, приводящие к трансформации клеток.

а — точечная мутация в протоонкогене превращает его в онкоген (миссенс-мутация в гене *c-ras* сопровождается заменой аминокислоты в 12-м положении Р21, снижением GTPазной активности G-белка и постоянной активацией АЦазы; б — амплификация, или появление множества копий одного гена, сопровождается увеличением количества продуктов этого гена, ускоряет прогрессию и повышает злокачественность опухоли. (В клетках некоторых

модуляции экспрессии генов на уровне транскрипции и трансляции (рис. 3.5). Показано, что рак чаще возникает из соматических клеток, чем из половых, поэтому можно сказать, что соматические мутации являются причиной основного числа опухолей.

Установлено, что в регуляции роста и дифференцировки клеток принимает участие более 100 различных генов и около 10 генов — супрессоров опухолевого роста, или антионкогенов (табл. 3.1). Продукты многих онкогенов имеют структурную гомологию с такими ФР и рФР, как эпидермальный ФР (ЭФР), ФР тромбоцитов, ФР фибробластов, инсулиноподобными факторами 1 или 2. Они обладают либо протеинкиназной активностью, либо являются аналогами регуляторных белков мультиферментных циклиновых комплексов или ДНК-связывающих белков. Антионкогены (p53, pRb, p21, p16, WT1) кодируют регуляторные белки, сдерживающие репликативный потенциал клеток, поэтому их инактивация влечет за собой нарушение контроля клеточной пролиферации. В последнее время внимание исследователей-онкологов привлекли гены, кодирующие циклины и циклинзависимые киназы: нормальные регуляторы клеточного цикла и их ингибиторы. Существует также большая группа генов-модуляторов, не вызывающих трансформации, но способствующих распространению опухоли в организме (гены главного комплекса гистосовместимости иммунного ответа; гены, контролирующие функционирование протеолитических ферментов, и др.).

Малигнизация клеток является следствием каскадного накопления в геноме различных нарушений. Для развития рака необходимо, чтобы произошли изменения не менее чем в 6—10 генетических факторах (теория многоступенчатого канцерогенеза). Изменения в пределах всего одной копии или аллеля протоонкогена достаточны для превращения его в онкоген с возросшей стимулирующей пролиферацию активностью, т.е. онкогены можно рассматривать как доминантные трансформирующие гены. Антионкогены, напротив, проявляются рецес-

опухолей ген дигидрофолатредуктазы — ключевого фермента в синтезе тимидиловых и пуриновых нуклеотидов амплифицирован и повышает активность фермента более чем в 400 раз.); в — хромосомные транслокации приводят к перемещению участка одной хромосомы в другую. Часто происходит реципрокная транслокация, при которой 2 хромосомы обмениваются участками, как в случае образования филадельфийской хромосомы; г — вставка генетического материала вируса представляет собой включение в геном человека дополнительных промоторов и/или энхансеров, так как генетический материал вируса фланкирован с обоих концов последовательностями LTR (long terminal repeats), которые действуют как промоторы и энхансеры транскрипции.

Функции онкобелков и их связь с развитием опухоли

Таблица 3.1

Онкобелки	Функция	Вид опухоли
HST PDGF/SIS	Факторы роста	Карцинома легких, желудка Остеосаркома
ERB B2/NEU RET TRK	Тирозин-киназы	Рецепторные
ABL FES		Нерецепторные
SCR YES		Нерецепторные, ассоциированные с мембраной
MAS, MPL	Рецепторы, не обладающие протеинкиназной активностью	Рак эпидермиса
H-RAS K-RAS N-RAS	G-белки	Карциномы поджелудочной железы и щитовидной железы, толстой кишки
RAF MOS	Цитоплазматические Сер/Тре-ПК	Глиобластома, саркомы, рак желудка
MYS MYB	Факторы транскрипции	Солидные опухоли разной локализации Лейкемии, лимфомы
BCL-2	Супрессор апоптоза	В-клеточная лимфома

сивным образом, т.е. для нарушения клеточной пролиферации и дифференцировки необходима инактивация обоих аллелей. Присутствие изменений в обоих аллелях переводит клетку из гетерозиготного в гомозиготное состояние, т.е. наблюдается потеря гетерозиготности — loss of heterozygosity (LOH). Среди генов — супрессоров опухолей исключением является ген p53, повреждение в одном из аллелей которого ведет к изменению функций белка.

Спектр изменений генетического материала в каждой конкретной опухоли имеет индивидуальный характер, однако наличие общих закономерностей для неоплазм определенной локализации дает основание связывать их с патологией определенного органа (см. табл. 3.1). Так, в карциномах молочной

железы и яичников часто встречается онкоген erb B2 или neu, являющийся гомологом рЭФР. Молекула рецептора содержит три домена: внеклеточный, или рецепторный, домен; домен, пронизывающий мембрану; внутриклеточный домен, обладающий активностью тир-ПК. В ходе трансформации этот ген амплифицируется и утрачивает фрагмент, содержащий информацию о рецепторном домене. В результате в клетках образуется белок с нерегулируемой тир-ПК активностью («эффект нажатой кнопки»).

Онкогены ret и trk, обнаруженные в более чем 50 % карцином щитовидной железы, являются результатом внутрихромосомных перестроек, в результате которых возникают белки, содержащие домены, закодированные в двух разных генах.

Нерецепторную тир-ПК кодирует src-онкоген, а сер/тре-ПК — онкогены mos и raf. Мутации, приводящие к постоянной активации этих ферментов, способствуют неопластической трансформации. Рецепторные и нерецепторные ПК катализируют фосфорилирование одной из изоформ фосфолипазы C и включают инозитолфосфатный путь передачи сигнала, активируют транскрипционные факторы и побуждают клетку к пролиферации.

Другую группу составляют ras-онкогены (H-ras, K-ras, N-ras). Они располагаются на трех разных хромосомах и кодируют сходные по структуре G-белки, у которых в результате мутации по типу замены (миссенс-мутация) в ГТФ-связывающем домене снижена ГТФазная активность. Это сопровождается стабильной активацией инозитолфосфатного или аденилатциклазного сигнального пути. RAS-онкобелки обнаружены в 25 % всех опухолей человека: почти в 90 % карцином поджелудочной железы и более чем в 50 % карцином толстой кишки.

В опухолевых клетках часто встречаются транслокации генов из одной хромосомы в другую. Изменение положения гена в ряде случаев увеличивает его экспрессию и стимулирует малигнизацию. Так, при хронической миелоидной лейкемии протоонкоген abl транслоцирует из хромосомы 9 в хромосому 22 (t 9 : 22) с образованием филаделфийской хромосомы, которая легко обнаруживается при рассмотрении хромосом под микроскопом. В результате транслокации появляется гибридный ген c-abl-bcr, кодирующий химерный белок с высокой активностью тир-ПК. При лимфоме Беркитта протоонкоген c-myc претерпевает транслокацию из хромосомы 8 в хромосому 14 (t 8 : 14) у 90 % больных, а в 10 % случаев наблюдается t 8 : 2 или t 8 : 22. Во всех случаях ген c-myc транслоцируется в область сильного промотора тяжелых или легких цепей иммуноглобулинов, что вызывает гиперпродукцию нормально-

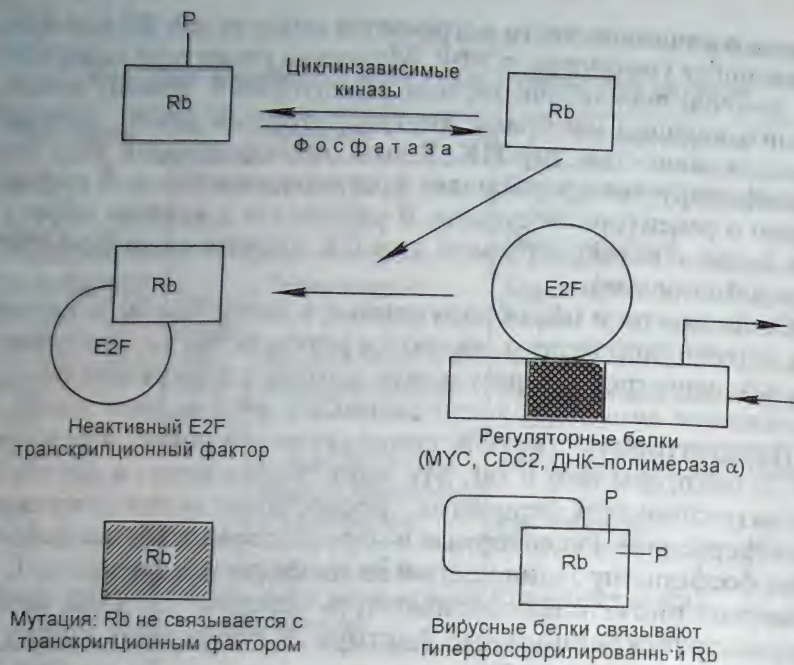


Рис. 3.6. Механизм действия PRb.

го С-МЫС белка, который кодирует транскрипционный фактор, участвующий на ранних стадиях в регуляции пролиферации.

В большинстве опухолей обнаруживается сразу несколько онкогенов. Особенно часто встречаются мутации в генах — супрессорах опухолей, которые кодируют белки, ингибирующие аномальный рост и трансформацию клеток.

Описано более 10 супрессорных белков. Наиболее изученными из них являются Rb и P53. Так, при ретинобластоме — редком детском онкологическом заболевании сетчатки глаза наблюдается инактивация гена Rb1, кодирующего ядерный белок с мол. массой 105 000. В норме этот белок ингибирует пролиферацию клеток, так как способен связываться и инактивировать транскрипционный фактор E2F, который в свою очередь усиливает экспрессию ростстимулирующих белков и ферментов: ДНК-полимеразы α , MYC, CDC2 (рис. 3.6). Однако Rb перестает влиять на переход клетки из G₁ в S-период, если он фосфорилирован или инактивирован связыванием с другими белками-ингибиторами, а также в результате мутаций в гене. Это стимулирует пролиферативный процесс.

Другим антионкогеном является P53. Его функция наиболее часто нарушена у онкологических больных. Этот антион-

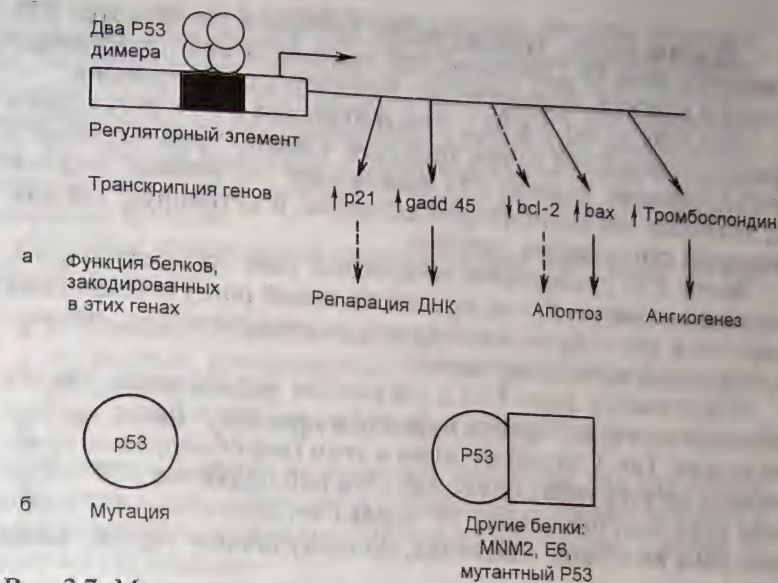


Рис. 3.7. Механизм действия белка P53.

а — основные гены-мишени, экспрессию которых регулирует P53; б — инактивация P53 в результате мутаций в гене или связывания с белками-ингибиторами.

коген кодирует ядерный белок с мол. массой 53 000, которой, будучи транскрипционным фактором, контролирует в клетках чрезвычайно важные функции: после повреждения ДНК ингибирует пролиферацию и активирует ее репарацию, но если последняя невозможна, то побуждает клетки к апоптозу, а также подавляет ангиогенез в опухолях.

Белок P53 состоит из трех доменов: регулирующего транскрипцию, обеспечивающего связывание с ДНК и ответственного за олигомеризацию. Он связывается с регуляторными участками ДНК в виде тетрамера и имеет значительное число генов-мишеней, в которых есть последовательности, способные присоединять P53 и таким образом менять свою активность (рис. 3.7). К генам, экспрессия которых зависит от P53, относится ген waf1, кодирующий белок — ингибитор циклинзависимой киназы. В последние годы в клетках обнаружена группа белков — циклинов, которые активируют более десятка гомологичных по структуре сер/тре-ПК, названных циклинзависимыми протеинкиназами. Образуя комплексы с циклинами, эти ПК фосфорилируют белки, осуществляющие продвижение клетки по клеточному циклу и обеспечивающие преодоление G₁/S и G₁/M проверочных точек. Белок P53 увеличивает экспрессию гена waf1 и синтез белка P21.

Другим геном, транскрипция которого усиливается P53, является gadd 45. Показано, что экспрессия этого гена возрастает в клетках, подвергнутых ионизирующей радиации.

Два гена — bcl-2 и bax, чувствительные к P53, регулируют разрушение клеток путем апоптоза. Однако присоединение к регуляторному участку P53 прекращает экспрессию гена bcl-2, являющегося ингибитором апоптоза, и активирует ген bax, который стимулирует апоптоз.

Белок P53 увеличивает экспрессию гена тромбоспондина, который кодирует белок, препятствующий росту кровеносных сосудов в опухоли — ангиогенезу и, следовательно, предотвращающий метастазирование.

Центральная роль P53 в регуляции метаболизма клетки объясняет, почему частота мутаций в гене этого белка особенно велика. Так, у людей мутации в этом гене обнаружены практически во всех типах опухолей. Они наблюдаются в 70 % случаев рака толстой кишки, 56 % рака легкого и 40—45 % случаев рака яичников, пищевода, поджелудочной железы, кожи и желудка.

Супрессором опухолей является также продукт гена wt1, представляющий собой цинксодержащий белок, связывание которого с ДНК подавляет транскрипцию ряда факторов роста. Инактивация этого гена приводит к развитию опухоли Вилмса.

Таким образом, согласно современным представлениям, инактивация, амплификация или накопление мутаций в генах, кодирующих белки, участвующие в регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза, включение механизма поддержания длины теломера создают предпосылки для трансформации и иммортализации клеток.

3.6. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ РАКА

3.6.1. ОПУХОЛЕВЫЕ МАРКЕРЫ

Одним из направлений в развитии диагностики онкологических заболеваний является поиск и создание методов выявления индикаторов опухолевого процесса — опухолевых маркеров.

Опухолевыми маркерами (ОМ) называют соединения: белки, биологически активные пептиды, гормоны, ферменты и метаболиты, которые синтезируются раковыми клетками либо клетками нормальных тканей в ответ на развитие рака. Они должны синтезироваться только в организме опухоленосите-

ля и отсутствовать в нормальных клетках, так как являются продуктами аномальной экспрессии генома раковой клетки. ОМ, как правило, обнаруживают в крови или других биологических жидкостях организма и используют для скрининга населения на носительство опухоли, как прогностический фактор, для оценки состояния пациента в клинической стадии и мониторинга в ходе лечения, а также в целях обнаружения рецидивов болезни.

Согласно современной классификации, ОМ делят на три основные группы:

- ▲ первичные опухолево-ассоциированные;
- ▲ вторичные, продуцируемые опухолью (специфические и неспецифические);
- ▲ вторичные, индуцируемые опухолевой болезнью.

Эта классификация не лишена недостатков, так как одно и то же соединение может синтезироваться клетками опухоли и вырабатываться нормальными клетками органа в ответ на опухолевую инвазию.

Значимость ОМ оценивают по следующим критериям: 1) диагностическая чувствительность; 2) специфичность; 3) эффективность. Данные показатели рассчитывают на основании определения ОМ в группе больных и группе контроля, которая обычно представлена практически здоровыми людьми и больными с неопухолевыми заболеваниями того же органа, что и у опухоленосителей. Первый показатель характеризует способность теста выявить заболевание у больного, второй — способность теста давать отрицательный результат в группе здоровых, а третий показатель — способность различать опухолевые и неопухолевые заболевания.

Современные биохимические и иммунологические методы позволяют выявить неоплазму, когда число опухолевых клеток достигает 10^9 — 10^{10} , а уровень секретируемого опухолью маркера от 1 до нескольких фемтомолей на 1 мл биологической жидкости. Следует отметить, что большинство известных в настоящее время ОМ не отвечает этим критериям. Почти во всех случаях при ряде таких патологических состояний, как воспалительные заболевания печени, поджелудочной железы и легких, отмечается неспецифическое, часто незначительное повышение уровня маркера.

В клинической практике наиболее часто используют такие онкофетальные белки, как раковый эмбриональный антиген, α -фетопроtein (АФП), плацентарные белки (хорионический гонадотропин β -НСГ, плацентарная щелочная фосфатаза и др.), дифференцировочные антигены лимфоцитов: тканевый полипептидный специфический антиген или тканевый поли-

пептидный антиген. Так, например, для диагностики и контроля за эффективностью терапии при различных морфологических вариантах рака легкого наиболее перспективно определение нейронспецифической енолазы (НСЕ) и САИФРА 21-1. САИФРА представляет собой растворимый фрагмент цитокератина — структурного компонента цитоскелета эпителия бронхов.

Для рака предстательной железы в качестве ОМ наиболее чувствителен простатический специфический антиген. Он практически не определяется у женщин, у мужчин в норме его уровень ниже 2 нг/мл, но существенно возрастает в злокачественных и доброкачественных опухолях. Наиболее специфичным ОМ первичной карциномы печени является АФП, а β -НСГ — трофобластных опухолей.

К ОМ, появляющимся в организме больного в ответ на развитие опухолевого процесса, относят белки острой фазы воспаления, ферритин, церулоплазмин, гаптоглобулин, С-реактивный белок, изоформы ЛДГ и креатинкиназы и ряд др.

3.6.2. ХИМИОТЕРАПИЯ

При обнаружении опухоли или на более поздних стадиях онкологического заболевания используют химио- и радиотерапию, а также симптоматическое лечение. Очень важным является возможно более полное хирургическое удаление неоплазмы. К лечебным мероприятиям, нашедшим применение в клинической практике, предъявляется два основных требования: оказывать цитостатический (предотвращающий пролиферацию) и цитотоксический (уничтожающий опухолевые клетки) эффекты. Однако химиотерапия прекращает синтез ДНК и клеточное деление по механизмам, общим для всех клеток, отсюда ее токсичность и многочисленные побочные эффекты. Успех лечения связан с большей чувствительностью к лекарственным средствам неопластических клеток по сравнению с нормальными, неизмененными клетками и отражает компромисс между эффективностью в отношении опухоли и токсичностью для здоровых тканей.

В химиотерапии используют алкилирующие агенты: цисплатин, мелфалан, циклофосфамид и др., вызывающие поперечные сшивки в нитях ДНК; антиметаболиты: цитозин арабинозид, гидроксимочевина, метотрексат, ингибирующие синтез нуклеиновых кислот и нуклеотидов, антибиотики: блеомицин, даунорубин, доксорубин, интеркалирующие между азотистыми основаниями ДНК и вызывающие хромосомные разрывы и фрагментацию макромолекул; некоторые растительные

Таблица 3.2

Механизм действия некоторых препаратов, используемых при лечении больных раком

Этапы на пути реализации генетической информации	Препарат	Механизм действия
Синтез: пуринов	Меркаптопурин Тиогуанин Метотрексат	Ингибируют образование пуринового кольца
дезоксирибонуклеотидов	Гидроксимочевина	Ингибирует рибонуклеотид-редуктазу
ДНК	Фторурацил Метотрексат Иприт Цитозинарабинозид Дауномицин Доксорубин Блеомицин Этопозид	Ингибируют образование dTMP Модифицируют ДНК-матрицу и нарушают репарацию
РНК белка	Актиномицин D Аспарагиназа	Ингибирует рост цепи РНК Дезамидирует аспарагин, лишая лейкозные клетки этой незаменимой для них аминокислоты
Формирование оргanelл	Винбластин Винкристин	Нарушают формирование микротрубочек

продукты, интерферон, аспарагиназу и антагонисты половых гормонов (табл. 3.2). Однако до настоящего времени химиотерапия во многих случаях остается малоэффективной.

Главная причина низкой эффективности химиотерапии — множественная лекарственная устойчивость (МЛУ), которая развивается у больного в ответ на многократное введение химиопрепарата. МЛУ является результатом суперэкспрессии Р-гликопротеина (Р170) и ряда глутатионзависимых ферментов, осуществляющих детоксикацию лекарственных средств. Р170 — это энергозависимый трансмембранный насос, он за счет энергии АТФ осуществляет «откачку» противоопухолевых препаратов из раковых клеток и препятствует их накоплению в цитотоксических концентрациях.

Практика показала, что лечение одним лекарственным препаратом, за редким исключением, не способно привести к

исцелению. Как правило, химиотерапию сочетают с радиотерапией, вызывающей в облученной ткани индуцированные свободными радикалами разрывы нитей ДНК и апоптоз. Перспективным направлением стала фотодинамическая терапия, стимулирующая разрушение опухоли воздействием введенных в опухоль веществ, которые переводят в активированное состояние с помощью излучения лазера.

Вселяющим новые надежды на успех в лечении рака стало создание разных моделей направленной доставки химиопрепаратов в пораженную ткань с помощью антител к антигенам опухолей, фетальных белков и факторов роста к их рецепторам, которые суперэкспрессированы на плазматической мембране раковых клеток. В этом отношении перспективным является цикл работ по созданию конъюгатов противоопухолевых препаратов с АФП и ЭФР в качестве векторных молекул. Были показаны доступность этих белков в препаративных количествах, стабильность и сохранение высокого сродства к рецептору после химической модификации. Кроме того, рецепторы АФП выявлены практически на всех типах раковых клеток, но отсутствуют или имеются в небольших количествах на клетках нормальных тканей. На поверхности опухолевых клеток эпителиального происхождения в больших количествах присутствуют рецепторы ЭФР. Все это определило возможность использовать указанные белки для избирательного транспорта противоопухолевых препаратов в опухолевые ткани. На основе данных белков созданы препараты направленного действия с цитотоксическими веществами различных классов: антибиотиками (например, доксорубицином и карминомицином), растительными алкалоидами: винбластином и винкристином и фталоцианинами алюминия и кобальта. Показано, что активность конъюгатов значительно превышает активность свободных цитотоксических препаратов. Они оказались эффективными при лечении резистентных к химиотерапевтическим препаратам опухолей, благодаря чему их назначают в значительно более низких дозах, чем свободные препараты, что позволяет избежать побочных эффектов. Планируется клиническая апробация этих лекарственных средств.

В стадии разработки и многие другие подходы к лечению онкологических заболеваний: поиски ингибиторов протеаз и возможностей модулировать содержание интегринов, которые способны были бы остановить метастазирование.

Возникло направление генной терапии, которое ставит перед собой задачу найти способы восстановления функций генов, ингибирующих пролиферацию и рост, и выключения онкогенов, нарушающих согласованность процессов роста, диф-

ференцировки и апоптоза. Это вселяет надежду, что в ближайшие годы человечество сможет более эффективно бороться за жизнь и здоровье онкологических больных.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ

1. Сравнительное исследование метаболизма нормальных и опухолевых клеток показало, что трансформированные клетки обладают существенными преимуществами в скорости роста и размножения. Объясните, какие причины позволяют опухоли, как правило, за короткий промежуток времени наращивать большую массу клеток и нарушать снабжение нормальных клеток метаболитами и источниками энергии.

2. Больной Б., 56 лет, куривший в течение 40 лет, поступил в онкологическое отделение больницы с подозрением на рак легкого, так как в ходе флюорографического обследования в верхней части правого легкого был зарегистрирован узел. После тщательного обследования была предложена операция по иссечению узла с последующей химиотерапией. Лечащий врач сделал предположение, что основной причиной заболевания стало многолетнее курение. Объясните правомерность предположения врача.

3. Больной Б. (см. задачу 2) хорошо перенес операцию, в течение 6 мес состояние его здоровья было удовлетворительным. Затем он стал отмечать периодически возникающие и постепенно усиливающиеся головные боли. В клинике была проведена компьютерная томография, которая показала появление метастазов в мозге.

А. Чем может быть вызвано появление метастазов? Б. Почему метастазы могут возникнуть на фоне проведенного курса химиотерапии?

4. В клетках костного мозга у 85 % больных хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ) обнаруживается специфическая филадельфийская хромосома. Продуктом какого рода изменений в геноме является образование необычной хромосомы?

5. Сравнительные исследования прото- и онкогенов показали, что клеточные онкогены обнаруживают либо полную идентичность, либо сравнительно небольшие структурные различия с нормальными генами. Объясните основные механизмы превращения протоонкогенов в онкогены.

6. Белок Р53 выполняет функцию супрессора опухолей. Обнаружено, что функционально неактивный Р53 встречается у 70 % больных раком прямой кишки, у 50 % — раком легких и у 40 % больных — раком молочной железы. Объясните, как белок Р53 обеспечивает подавление роста опухоли и каковы причины его инактивации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биохимия/П/р В.П. Скулачева. — М.: МАИК «Наука», 1997. — Т. 62, вып. 11. — С. 1379—1565.

2. Вопросы биол., мед. и фарм. химии. — 1998. — Вып. 1. — С. 17—25.

3. Киселев Ф.Л., Павлиш О.А., Татосян А.Г. Молекулярные основы канцерогенеза у человека. — М.: Медицина, 1990. — 316 с.

4. Лихтенштейн А.В., Бассалык Л.С. Введение в проблемы биохимии и физиологии опухолевого роста. — В кн.: Элементы патологической физиологии и биохимии. — М.: Изд-во МГУ, 1997. — С. 115—136.

5. Robert Roskoski. Biochemistry of Cancer//Biochemistry. — 1996. — Vol. 41. — P. 436—456.

6. Roger J. King. Cancer Biology. — Longman, 1996. — 226 p.

7. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. Cancer, Cancer Genes and Growth Factors. — In: Harper's Biochemistry. sect. VI, 62; Prentice-Hall International, Inc., 1996. — P. 757—778.

Глава 4

ПАТОХИМИЯ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА

4.1. МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ЦИКЛА МОЧЕВИНЫ

В процессах катаболизма в тканях постоянно образуется аммиак, однако его концентрация в крови составляет 20—40 мкмоль/л. Аммиак, образующийся в тканях, доставляется в печень (в основном в составе аланина и глутамина) и включается в цикл синтеза мочевины. Мочевина — основной конечный продукт азотистого обмена — составляет 90 % от всех азотсодержащих компонентов мочи. Ежедневно с мочой выводится 25—30 г мочевины.

Цикл мочевины включает 5 реакций, в результате которых происходит связывание двух молекул аммиака. Одна молекула аммиака включается в орнитиновый цикл в митохондриях, а вторую предоставляет аспартат из цитозоля (рис. 4.1).

Основным источником аммиака является метаболизм аминокислот, поэтому нарушения синтеза мочевины можно рассматривать как аминоацидопатии.

Известно несколько типов таких нарушений, причиной которых является дефект одного из ферментов орнитинового цикла.

Все нарушения орнитинового цикла проявляются накоплением промежуточных продуктов синтеза мочевины и гипераммониемией (табл. 4.1).

Наиболее тяжелая гипераммониемия наблюдается при дефекте карбамоилфосфатсинтетазы I (гипераммониемия I типа) и орнитинкарбамоилфосфаттрансферазы (гипераммониемия II типа). В обоих случаях концентрация аммиака в крови может достигать 6 ммоль/л (N-60 мкмоль/л). Карбамоилфосфатсинтетаза I инактивируется в отсутствие N-ацетилглутамата, который синтезируется в митохондриях из ацетил-CoA и глутамата и является аллостерическим активатором КФ-синтетазы I. Очевидно, фенотипические варианты гипераммониемии могут быть следствием дефекта и N-ацетилглутаматсинтетазы.

При дефекте орнитин-карбамоилфосфаттрансферазы (гипераммониемия II типа) нарушается нормальный транспорт связанного аммиака, что приводит к двум основным последствиям: 1) карбамоилфосфат накапливается в митохондриях и часть его переносится в цитозоль, увеличивая скорость синте-

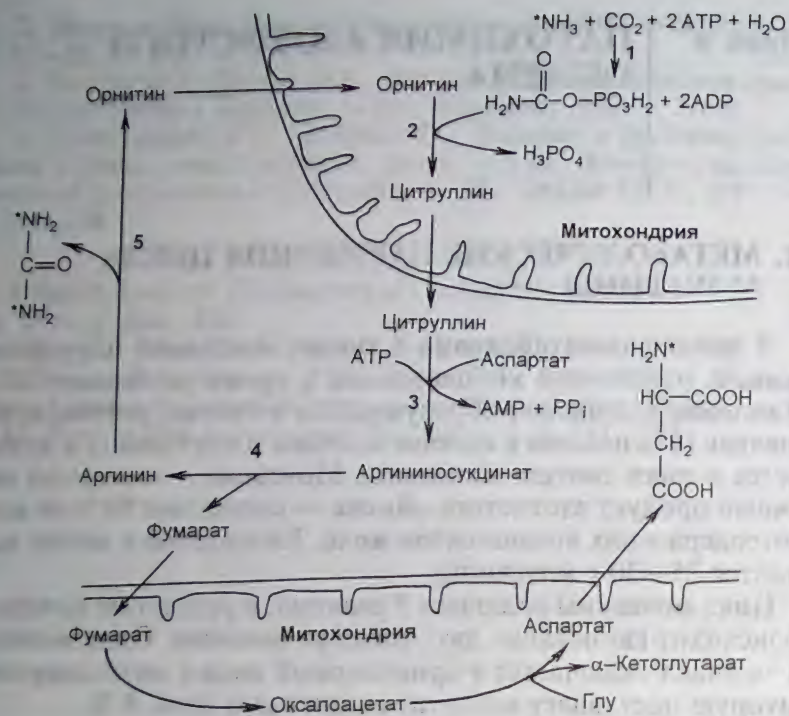


Рис. 4.1. Цикл синтеза мочевины.

1 — карбамоилфосфатсинтетаза I; 2 — орнитинкарбамоилтрансфераза; 3 — аргининосукцинатсинтетаза; 4 — аргининосукцинатлиаза; 5 — аргиназа. Звездочкой отмечены молекулы аммиака, принимающие участие в цикле синтеза мочевины.

за пиримидинов; 2) с мочой выделяются оротат, уридин и урацил, которые образуются в цитозоле при участии карбамоилфосфатсинтетазы II при избытке субстратов, не используемых для синтеза мочевины.

Цитруллимия возникает при дефекте аргининосукцинатсинтетазы. Образующийся в митохондриях цитруллин в норме включается в цитозоле в реакцию образования аргининоянтранной кислоты. При дефекте аргининосукцинатсинтетазы концентрация цитруллина в крови, моче, цереброспинальной жидкости может повышаться более чем в 100 раз (норма — 10—20 мкмоль/л).

Выведение аммиака при цитруллинении снижено по сравнению с нормой, но все же обеспечивает более широкий спектр проявлений, чем при дефектах первых двух ферментов орнитинового цикла. У многих больных даже при поздно проявляющейся цитруллинении отмечается некоторая степень умственной отсталости. Это подтверждает значение реакции, катализируемой аргининосукцинатсинтетазой, в которой про-

Наследственные дефекты ферментов орнитинового цикла и основные их проявления

Таблица 4.1

Дефект фермента	Тип наследования	Клинические проявления	Метаболиты		Лечение
			кровь	моча	
Карбамоилфосфатсинтетаза I	Аутосомно-рецессивный	В течение 24-48 ч после рождения развиваются гипераммониемия, кома и наступает смерть	Глутамин ↑ Аламин ↑	Оротат	Гемодиализ Снижение количества белков в пище, бензоат, фенилацетат
Орнитинкарбамоилфосфаттрансфераза	Сцепленный с X-хромосомой	Гипераммониемия, летаргия, гипотония, снижение толерантности к белкам	Глутамин ↑ Аламин ↑	Оротат	Малобелковая диета Фенилацетат Глутамат Цитруллин
Аргининосукцинатсинтетаза	Аутосомно-рецессивный	Гипераммониемия тяжелая у новорожденных; у взрослых возникает после белковой нагрузки	Цитруллин ↑	Цитруллин ↑	Сокращение белков в пище, аргинин, глутамат
Аргининосукцинатлиаза	Аутосомно-рецессивный	Гипераммониемия, атаксия, судороги, выпадение волос	Аргининосукцинат ↑	Аргининосукцинат, глутамин, аламин, лизин	Ограничение белков, аргинин
Аргиназа	Аутосомно-рецессивный	Гипераргининемия	Аргинин	Аргинин, лизин, орнитин	Ограничение белков в пище

исходит связывание второй молекулы аммиака, доставляемой аспаратом.

Аргининосукцинурия возникает в результате дефекта аргининосукцинатазы и также может сопровождаться различными метаболическими нарушениями, однако у значительного числа больных с этой патологией продолжительность жизни больше, чем у имеющих дефекты первых трех ферментов.

При дефекте аргининосукцинатазы не происходит образования аргинина и снижена регенерация орнитина, в предшествующих реакциях происходит связывание двух молекул аммиака в карбамоилфосфат и аргининосукцинат.

В норме аргининосукцинат превращается в аргинин и фумарат. Фумарат включается в цикл Кребса, а аргинин распадается на мочевины и орнитин. Дефект последнего фермента цикла приводит к возникновению *аргининемии*.

Диагностика. Различные типы гипераммониемии диагностируют путем определения метаболитов орнитинового цикла в крови и моче или активности ферментов в биоптатах печени. Конечно, основным диагностическим признаком служит гипераммониемия. В большинстве хронических случаев концентрация аммиака в крови может повышаться только после белковой нагрузки или в течение острых осложненных заболеваний.

Лечение. При различных дефектах орнитинового цикла лечение в основном направлено на снижение концентрации аммиака за счет малобелковой диеты и стимуляцию его выведения в обход нарушенных реакций. Последнее может быть достигнуто двумя путями: 1) связыванием и выведением аммиака в обход орнитинового цикла в составе фенилацетилглутамина и гиппуровой кислоты (рис. 4.2); 2) повышением концентрации промежуточных метаболитов цикла, образующихся вне блокируемых реакций (рис. 4.3).

Бензойная кислота в печени быстро превращается в гиппуровую кислоту в реакции, катализируемой глицинацилазой. Гиппурат в свою очередь быстро выводится с мочой. Потери глицина восстанавливаются из двух источников: из серина и за счет синтеза глицина из аммиака и CO_2 в реакции, катализируемой глицинсинтазой. Каждый из этих путей обеспечивает включение одной молекулы аммиака на молекулу глицина. Фенилацетат конъюгируется с глутамином с образованием фенилацетилглутамина, который также быстро выводится с мочой.

Стимуляция интактных реакций выведением метаболитов орнитинового цикла основывается на том факте, что промежуточные продукты цикла мочевины менее токсичны, чем свободный аммиак. Так, при дефекте орнитинкарбамоилфосфат-

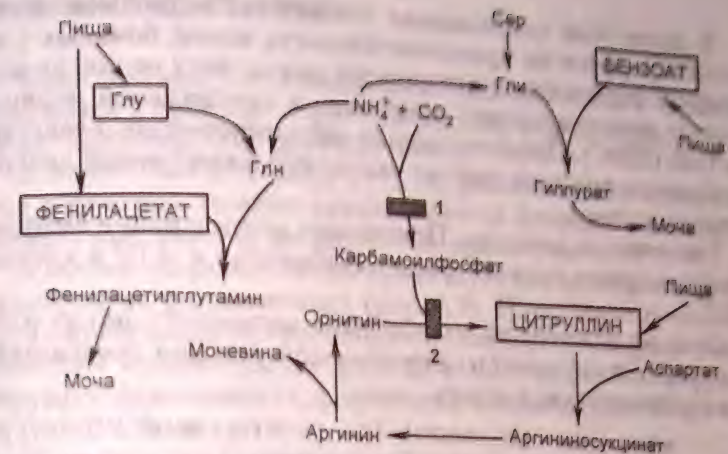


Рис. 4.2. Пути выведения аммиака при включении в диету бензоата, фенилацетата, глутамата и цитруллина. 1 и 2 — ферментные блоки.



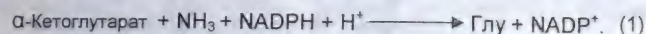
Рис. 4.3. Влияние аргинина, вводимого с пищей, на выведение аммиака при дефекте аргининосукцинатазы. Звездочкой отмечены продукты, в составе которых выводится аммиак.

трансферазы введение больших доз цитруллина стимулирует реакции синтеза мочевины в обход блока, увеличивая включение второй молекулы аммиака из аспартата (см. рис. 4.2). Введение больших доз аргинина при дефекте аргининосукцинатазы (см. рис. 4.3) стимулирует регенерацию орнитина и выведение аммиака в составе цитруллина и аргининосукцината.

В различных комбинациях эти методы оказывают значительный эффект на продолжительность жизни больных с дефектами ферментов орнитинового цикла, хотя не всегда полностью предотвращают изменения в центральной нервной системе (ЦНС). Предотвращение нейротоксического действия свободного аммиака требует как можно более ранней диагностики и лечения.

Токсичность аммиака. Повышение концентрации аммиака в плазме крови снижает фонд метаболитов и АТФ в клетках ЦНС.

Один из важнейших метаболитов цитратного цикла α -кетоглутарат в глутаматдегидрогеназной реакции превращается в глутаминовую кислоту.

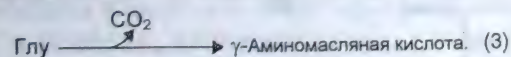


Глутамат в свою очередь используется для синтеза глутамина.



Накопление глутамина в клетках нейроглии приводит к повышению в них осмотического давления и набуханию астроцитов.

Аммиак в крови при pH 7,4 существует почти целиком в виде NH_4^+ . Ионы аммония проникают через плазматическую и митохондриальную мембраны с большим трудом. Повышение концентрации NH_4^+ создает препятствие для трансмембранного переноса других ионов и приводит к сдвигу pH. NH_3 составляет при pH 7,4 ~ 1 %, но он легко проходит через мембраны клеток и в митохондриях сдвигает равновесие глутаматдегидрогеназной реакции в сторону образования глутамина. Изменение метаболизма глутамата в сторону образования глутамина нарушает процесс синтеза важнейшего тормозного медиатора ЦНС γ -аминомасляной кислоты:



Нарушение метаболизма аминокислот в печени приводит к повышению концентрации в крови циклических аминокислот и жирных кислот с короткой цепью, что в свою очередь оказывает токсическое воздействие на клетки мозга.

Гипераммониемия может возникать при различных заболеваниях печени: циррозе, жировой дистрофии, гепатите.

У детей гипераммониемия может возникнуть при гриппе и других вирусных инфекциях. При этом обнаруживается снижение активности карбамоилфосфатсинтетазы I и орнитинкарбамоилфосфаттрансферазы, вероятно, вследствие специфического влияния вирусов на синтез этих ферментов.

4.2. ФЕНИЛКЕТОНУРИЯ

Фенилаланин — незаменимая аминокислота. Помимо включения в процесс биосинтеза белков, фенилаланин в печени метаболизируется двумя путями.

В норме большая часть (~75 %) фенилаланина превращается в тирозин. Реакция катализируется фенилаланингидроксилазой при участии дигидробиоптерина (рис. 4.4).

В печени здоровых людей существует альтернативный путь катаболизма фенилаланина (рис. 4.5). Нарушение основного пути катаболизма фенилаланина проявляется гиперфенилаланинемией и повышением в крови и моче содержания фенилпирувата, фенилацетата, фениллактата и фенилацетилглутамина (табл. 4.2).

Известны две гетерогенные группы наследственных нарушений обмена фенилаланина, сопровождающихся фенилаланинемией: 1) обусловленные дефектом фенилаланингидроксилазы и 2) являющиеся следствием дефектов ферментов, участвующих в синтезе и метаболизме тетрагидробиоптерина.

Фенилкетонурия (ФКУ) — наследственное заболевание, обусловленное мутациями в гене фенилаланингидроксилазы (*классическая ФКУ*). Мутации в этом гене могут затрагивать различные его участки и приводить как к полному отсутствию фермента, так и к различной степени снижения его активности.

Частота ФКУ у новорожденных в мире в среднем составляет 1:10 000—1:20 000. Тип наследования аутосомно-рецессивный.

Наиболее частая форма классической ФКУ проявляется характерным симптомокомплексом: умственная отсталость, судорожный синдром, склонность к экземе, нарушение пигментного обмена. От больных исходит специфический «мышин-

Таблица 4.2

Содержание метаболитов фенилаланина в плазме крови и моче при фенилкетонурии (ФКУ)

Метаболит	Плазма крови, мг/дл		Моча, мг/дл	
	норма	ФКУ	норма	ФКУ
Фенилаланин	1—2	15—63	30	300—1000
Фенилпируват	—	0,3—1,8	—	300—2000
Фениллактат	—	—	—	290—550
Фенилацетилглутамин	—	—	200—300	2400

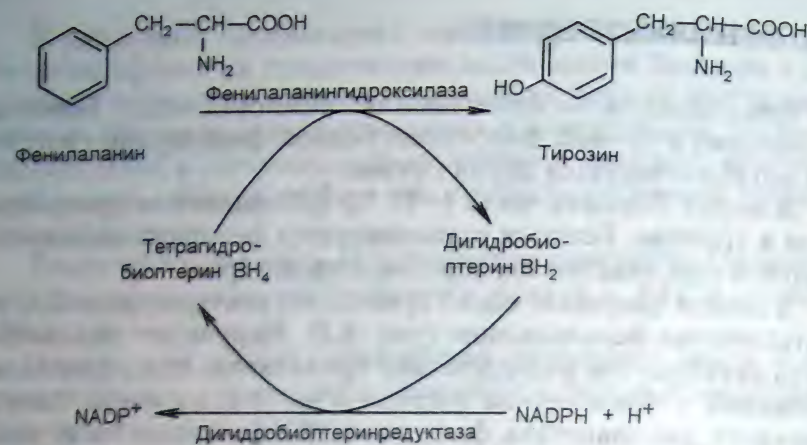


Рис. 4.4. Превращение фенилаланина в тирозин.

BH_4 синтезируется в организме из GTP, но в недостаточном количестве. Его регенерация при участии дигидробиптеринредуктазы является необходимым звеном в превращении фенилаланина в тирозин.

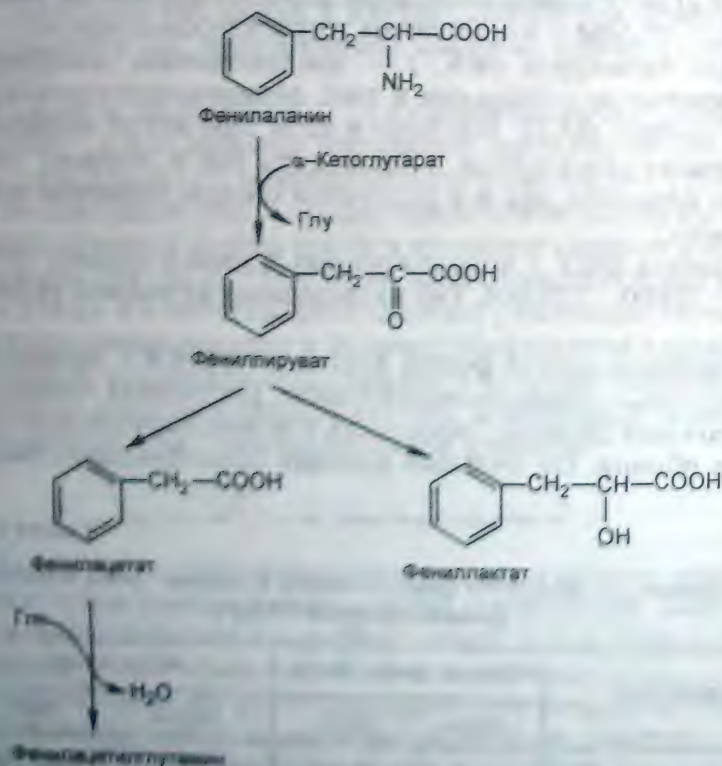


Рис. 4.5. Альтернативный путь катаболизма фенилаланина в печени. При нормальном функционировании фенилаланин-гидроксилазы этот путь не имеет существенного значения. Фенилацетат конъюгируется с глутамином и быстро выводится с мочой. При недостаточной активности фенилаланин-гидроксилазы этот путь становится преобладающим.

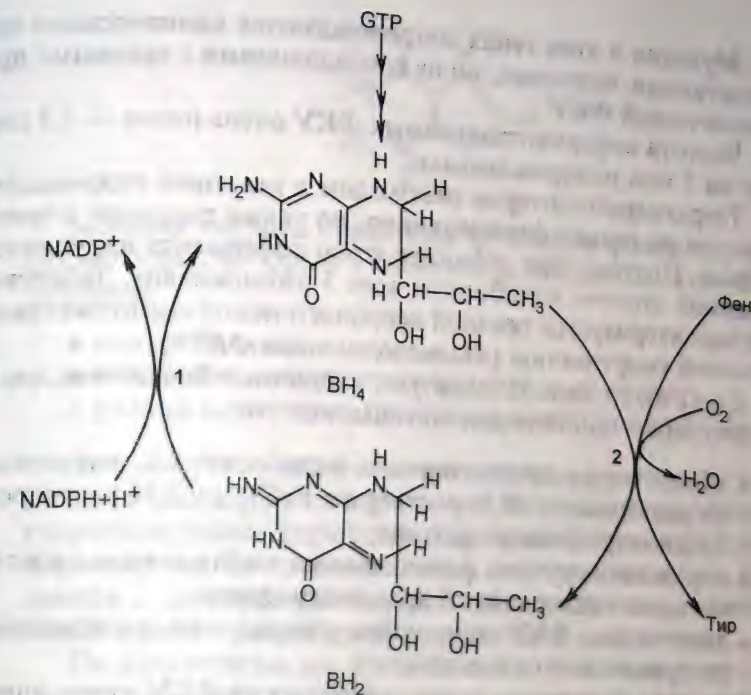


Рис. 4.6. Метаболизм тетрагидробиптерина.

1 — дигидробиптеринредуктаза; 2 — фенилаланин-гидроксилаза.

ный» запах, обусловленный высоким содержанием фенольных кислот в биологических жидкостях. Эти симптомы появляются в первый год жизни, и больные при отсутствии лечения, как правило, не доживают до 30 лет.

В патогенезе симптомов ФКУ основную роль играют нарушения обмена циклических аминокислот:

- увеличение концентрации фенилаланина ограничивает транспорт тирозина и триптофана через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и тормозит синтез нейромедиаторов;
- накопление фенилаланина в клетках мозга нарушает реакции синтеза цереброзидсульфатов, участвующих в защите мозга от демиелинизации;
- фенилаланин и его производные — фенольные кислоты (см. табл. 4.1) оказывают нейротоксическое действие. Они являются ингибиторами тирозингидроксилазы и триптофангидроксилазы — ключевых ферментов синтеза нейромедиаторов: дофамина, норадреналина, серотонина.

Коферментзависимая гиперфенилаланинемия (вариантная ФКУ) является следствием мутаций в генах, контролирующих метаболизм тетрагидробиптерина (рис. 4.6).

Мутации в этих генах сопровождаются клиническими последствиями, близкими, но не совпадающими с таковыми при классической ФКУ.

Частота коферментзависимых ФКУ очень низка — 1,2 случая на 1 млн новорожденных.

Тетрагидробиоптерин необходим в реакциях гидроксилирования не только фенилаланина, но также тирозина и триптофана. Поэтому при дефиците этого кофермента нарушается в равной степени метаболизм всех 3 аминокислот. Заболевание характеризуется тяжелой неврологической симптоматикой и ранней смертностью («злонакаственная ФКУ»).

Диагностика. Используют различные биохимические и молекулярно-генетические методы, как то:

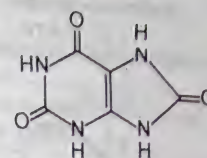
- обнаружение патологических метаболитов качественными реакциями с 10 % раствором FeCl_3 и 0,2 % раствором 2,4-динитрофенилгидразина;
- определение уровня фенилаланина в плазме крови и моче методом тонкослойной хроматографии;
- диагностика ФКУ на уровне мутантного гена с помощью рестрикционного анализа;
- массовый скрининг новорожденных на ФКУ путем определения концентрации фенилаланина в крови новорожденных.

При подтверждении диагноза ФКУ детям (в возрасте не более 3 нед) назначают диету с низким содержанием фенилаланина для предотвращения развития клинических симптомов. Многолетняя практика показала, что содержание на указанной диете до 8 лет (окончание процессов миелинизации мозга) дает положительные результаты.

Массовый скрининг новорожденных не предотвращает рождения больных детей. Первичная профилактика гиперфенилаланинемий возможна при использовании дородовой диагностики в семьях, имеющих больного ребенка, по результатам исследования биологического материала плода. Кроме того, возможно выявление носительства дефектного гена в медико-генетических консультациях путем определения толерантности к фенилаланину или методом ДНК-диагностики.

4.3. ПАТОХИМИЯ ПУРИНОВОГО ОБМЕНА

Пуриновые нуклеотиды являются частью общего фонда предшественников нуклеиновых кислот. Конечный продукт катаболизма пуринов — мочевая кислота.



Мочевая кислота образуется из общего фонда пуриновых нуклеотидов, который в свою очередь складывается из 3 источников:

- синтез *de novo*;
- катаболизм эндогенных нуклеиновых кислот;
- распад экзогенных (пищевых) нуклеиновых кислот.

Экзогенные нуклеиновые кислоты поступают в организм с пищей в составе нуклеопротеинов, которые последовательно гидролизуются ферментами до нуклеотидов и оснований и всасываются. Часть оснований в клетках кишечника превращается в мочевую кислоту. Большая часть мочевой кислоты выделяется почками, а небольшая часть — с калом.

Ни нуклеотиды, ни основания, поступающие в организм с пищей, практически не используются для синтеза нуклеиновых кислот, а превращаются в мочевую кислоту. Основной фонд нуклеотидов создается путем синтеза *de novo* из простых предшественников (рис. 4.7).

Помимо синтеза *de novo*, существует путь реутилизации нуклеотидов и оснований (см. рис. 4.7, реакции 3, 4). Синтез *de novo* через IMP происходит не во всех тканях. Эритроциты и полиморфно-ядерные лейкоциты не способны синтезировать 5-фосфорибозиламин. Для образования пуриновых нуклеотидов необходимы экзогенные основания очень малые количества фосфорибозилдифосфатамидотрансферазы. Основным местом синтеза *de novo* является печень. Из нее свободные основания или нуклеозиды доставляются в другие ткани, не способные к синтезу.

Фосфорибозилдифосфат является общим субстратом в синтезе пуринов (см. рис. 4.7). Его использование в большей степени зависит от скорости реутилизации оснований:

- 1) гуанин + PRDP \rightarrow GMP + PP_i ;
- 2) гипоксантин + PRDP \rightarrow IMP + PP_i ;
- 3) аденин + PRDP \rightarrow AMP + PP_i .

Если скорость реакций реутилизации снижается, уровень PRDP повышается в значительной степени, что стимулирует реакции синтеза IMP *de novo*. Мочевая кислота в основном

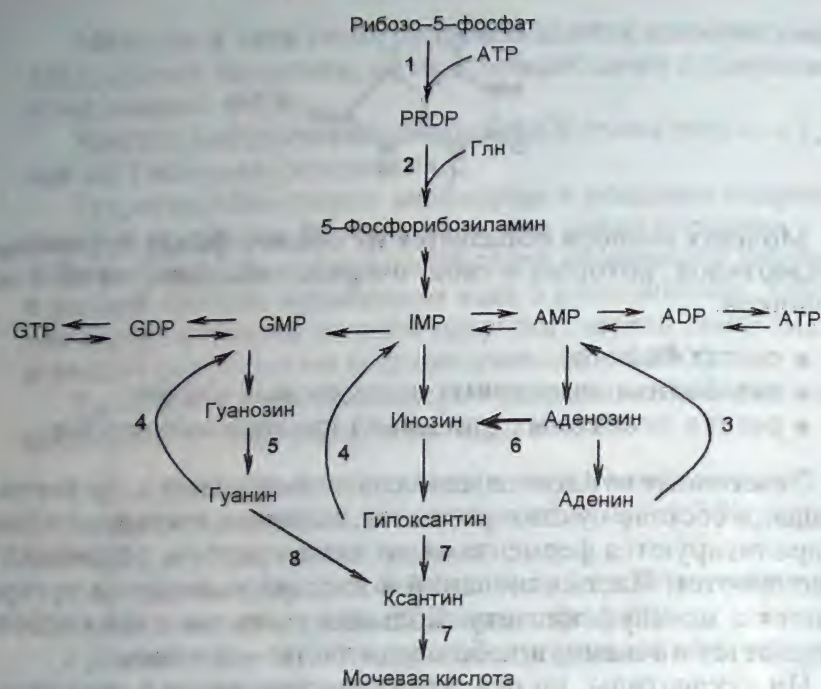


Рис. 4.7. Схема синтеза и катаболизма пуриновых нуклеотидов.

1 — фосфорибозилдифосфатсинтетаза; 2 — фосфорибозилдифосфатамидотрансфераза; 3 — аденинфосфорибозилтрансфераза; 4 — гуанингипоксантинфосфорибозилтрансфераза; 5 — нуклеозидфосфорилаза; 6 — аденозиндезаминаза; 7 — ксантиноксидаза; 8 — гуаназа.

(99 %) образуется из гипоксантина и гуанина. Превращение гипоксантина в ксантин и ксантина в мочевую кислоту катализируется ксантиноксидазой (см. рис. 4.7, реакция 7).

Ксантиноксидаза — флавопротеин, содержащий в качестве кофактора молибден. В плазме крови мочевая кислота находится в форме урата натрия и в комплексе с белками. Растворимость мочевой кислоты и урата натрия зависит от температуры и pH. При pH 7,4 и температуре тела 37 °C плазма крови насыщена мочевой кислотой в концентрации 7 мг/дл.

При снижении pH и температуры растворимость ухудшается. Концентрация мочевой кислоты в сыворотке крови выше у мужчин, чем у женщин (табл. 4.3).

В моче при pH 5,0 растворимость мочевой кислоты составляет ~15 мг/дл, при pH 7,0 — 150—200 мг. Реакция мочи зависит от состава пищи. При молочной диете pH мочи ~6,0, при овощной и фруктовой ~7,0. Механизм выведения мочевой кислоты почками включает несколько этапов. Она свободно фильтруется в клубочках, 90 % ее реабсорбируется в проксимальных канальцах. В дистальных канальцах мочевая кислота сно-

Таблица 4.3
Концентрация мочевой кислоты в сыворотке крови и моче взрослых

Пол	Концентрация мочевой кислоты в крови		Суточная экскреция с мочой, мг
	мг/дл	ммоль/л	
Мужчины	4,4—7,6	262—452	400—600
Женщины	2,3—6,6	137—393	

ва секретируется, а затем большая часть ее реабсорбируется. С мочой выделяется ~10 % того количества, которое фильтруется в клубочках.

Гиперурикемия — повышение концентрации мочевой кислоты в плазме крови. Причиной повышения может быть следующее:

- увеличение скорости синтеза пуринов;
- ускорение катаболизма нуклеиновых кислот (при заболеваниях, сопровождающихся клеточной пролиферацией: псориаз, рак, лимфома, лейкомия);
- снижение уровня экскреции.

Наиболее распространенным последствием гиперурикемии является подагра.

Подагра — хроническое заболевание, для которого характерны гиперурикемия и повторяющиеся острые артриты. Подагра возникает примерно у 20 % всех людей с гиперурикемией, чаще у мужчин старше 30 лет.

Одно из наиболее характерных проявлений подагры — подагрический артрит.

Приступы артрита начинаются, как правило, ночью с сильных болей в большом пальце ноги, в лодыжке или в стопе. На фоне усиления боли возникает озноб, повышается температура тела; в области пораженных суставов развивается воспаление.

Первые атаки продолжаются 1—3 дня, а затем прекращаются бесследно. Повторные нелеченные приступы могут длиться неделями, а интервалы между ними становятся короче. Причина приступов — отложение кристаллов мочевой кислоты и урата натрия в суставных хрящах, синовиальной оболочке и подкожной клетчатке периферических суставов.

Кристаллы уратов фагоцитируются, накапливаются в лизосомах, вследствие чего происходит разрушение лизосом и выход лизосомальных ферментов в цитозоль. Разрушение клеток стимулирует фагоцитоз.



Рис. 4.8. Подагрические тофусы.

Рецидивы артритов приводят к разрастанию соединительной ткани в области пораженных суставов, образованию узлов (тофусы) и деформации суставов (рис. 4.8). Тофусы состоят из кристаллов мочевой кислоты, окруженных воспалительной зоной.

Отложение кристаллов мочевой кислоты, вызывающее приступы

артрита, не всегда сочетается с резким повышением концентрации мочевой кислоты в плазме крови.

Существенную роль играют замедление тока крови в области периферических суставов и развитие метаболического ацидоза. В большом пальце стопы, который подвергается дополнительному влиянию гравитации, действующей против возвращения венозной крови к сердцу, эти явления особенно выражены. В дополнение к этому имеет значение снижение температуры тела во время сна.

Приступы артритов могут быть спровоцированы многими внешними факторами: алкоголь, физические перегрузки, операционные вмешательства, инфекции. Этанол, в частности, усиливает образование лактата, что вызывает снижение рН мочи и затрудняет выведение уратов.

Подагрический артрит следует дифференцировать от артритов другой этиологии: например, артритов, вызванных отложением кристаллов гидрооксипатита; инфекционных.

В первом случае характерным является повреждение крупных суставов (колени), во втором — наличие бактерий в синовиальной жидкости (хотя инфекция может присоединяться и при подагре, вторично).

Окончательный диагноз ставят после обнаружения в поляризационном микроскопе кристаллов моноводной соли уратов, которые имеют характерный игольчатый вид.

Вторым характерным проявлением подагры является уратная нефропатия. Выделяют несколько вариантов уратной нефропатии: 1) острая мочекишечная блокада канальцев почек; 2) хроническая уратная нефропатия, связанная с отложением уратов в ткани почек; 3) мочекишечный нефролитиаз.

По некоторым данным (Н.А.Мухин), нефролитиаз обнаруживается у 25 % больных с гиперурикемией (рис. 4.9).

Подагрическая нефропатия, как правило, приводит к нару-

шению функции почек. Острая почечная недостаточность обычно развивается в результате распада опухолей, при эмоциональных и физических стрессах, хирургических операциях.

Подагру принято рассматривать как семейное заболевание. Установлено несколько генетических дефектов ферментов обмена пуринов, при которых происходит избыточное образование экскретируемых пуринов (табл. 4.4).

При подагре в острый период применяют противовоспалительные средства (индометацин) и колхицин. Колхицин — алкалоид, угнетающий лейко- и лимфопоэз; тормозит фагоцитоз, снижает образование лактата в нейтрофилах, уменьшая таким образом выпадение кристаллов мочевой кислоты в очаге воспаления. Терапевтический эффект колхицина при остром приступе подагры настолько специфичен, что может быть использован как диагностический тест.

Рис. 4.9. Уратные камни из мочевых путей.



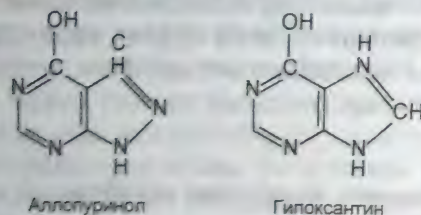
Таблица 4.4

Наследственные нарушения метаболизма пуринов

Дефектный фермент	Характеристика дефекта	Клинические проявления
Фосфорибозилдифосфатсинтетаза	Повышение активности фосфорибозилдифосфатсинтетазы, устойчивость к ретроингибированию, снижение K_m для рибозо-5-фосфата	Гиперурикемия, повышение экскреции уратов, подагра
Гуанингипоксантинфосфорибозилтрансфераза (GGPRT)	Частичная потеря активности GGPRT	То же
GGPRT	Полная потеря активности GGPRT	Синдром Леша — Нихана
Аденозиндезаминидаза	Потеря активности аденозиндезаминазы	Комбинированный (Т- и В-клетки) иммунодефицит, гипоурикемия, дезоксиденозинурия

Дефектный фермент	Характеристика дефекта	Клинические проявления
Пуриннуклеозидфосфоорилаза	Потеря активности пуриннуклеозидфосфоорилазы	Иммунодефицит (Т-клетки)
Аденозинфосфорибозилтрансфераза	Полная потеря активности аденинфосфорибозилтрансферазы	Почечно-каменная болезнь (2,8-дигидроксиадениловые камни)
Ксантиноксидаза	Полная потеря активности ксантиноксидазы	Гипоурикемия, ксантиновые камни в почках

В период между обострениями болезни эффективен аллопуринол — структурный аналог гипоксантина.



Аллопуринол вызывает двойкий эффект:

1) ингибирует ксантиноксидазу (рис. 4.10). С мочой выводится гипоксантин, растворимость которого выше, чем мочевой кислоты;

2) как псевдосубстрат включается в запасный путь синтеза нуклеотидов. Это приводит к уменьшению фонда PRDP и торможению синтеза пуринов de novo.

Применяются также алломарон (аллопуринол + бензбромарон) — ингибитор фосфорибозилдифосфатсинтетазы.

Дополнительные лечебные мероприятия: обильное щелочное питье (не менее 3 л в сутки), малобелковая диета.

Пациентам с бессимптомной гиперурикемией (>9 мг/дл), особенно в возрасте старше 40 лет, рекомендуется профилактическое назначение антигиперурикемических препаратов.

Синдром Леша — Нихана — наследственное заболевание, причиной которого является полная потеря активности гуанингипоксантинфосфорибозилтрансферазы. Заболевание наследуется как сцепленный с X-хромосомой рецессивный при-

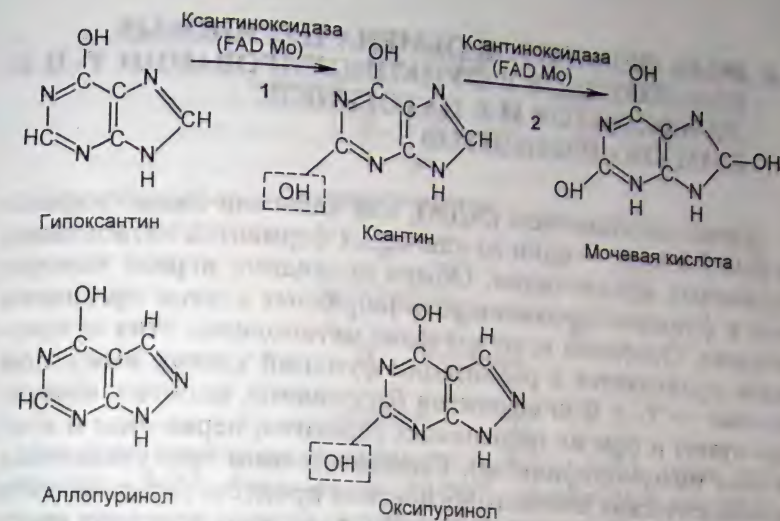


Рис. 4.10. Ингибирование ксантиноксидазы аллопуринолом.

Ксантиноксидаза способна катализировать первую реакцию, используя в качестве субстрата аллопуринол. Образовавшийся оксипуринол остается связанным в активном центре фермента.

знак. Клинически проявляется церебральными параличами, умственной отсталостью, членовредительством, ярко выраженной гиперурикемией (в 4—6 раз выше нормы). Гиперурикемия при этом заболевании является следствием повышения внутриклеточной концентрации PRDP и синтеза пуринов de novo в результате уменьшения использования PRDP в процессе синтеза пуриновых нуклеотидов.

Гипоурикемия может быть следствием либо увеличения экскреции, либо снижения скорости образования уратов.

В результате увеличения экскреции уратов (гипоксантина и ксантина) развивается ксантинурия (см. табл. 4.4).

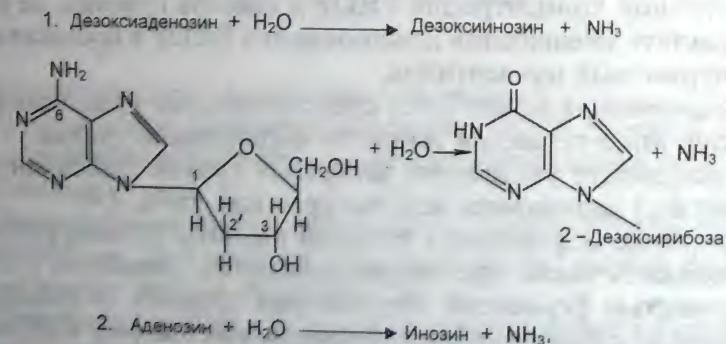
Снижение образования мочевой кислоты и гипоурикемия наблюдаются также при иммунодефицитах, связанных с недостаточностью ферментов метаболизма пуринов — аденозиндезаминазы и пуриннуклеозидфосфоорилазы (см. рис. 4.10; табл. 4.4).

Оба заболевания наследуются по аутосомно-рецессивному типу. Метаболические нарушения при них связаны с накоплением dATP, который аллостерически ингибирует рибонуклеотидредуктазу — ключевой фермент синтеза дезоксирибонуклеотидов, следствием чего является нарушение синтеза ДНК в лимфоцитах, что в свою очередь приводит к нарушению их созреванию.

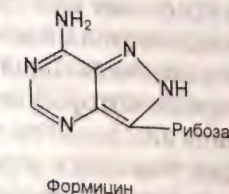
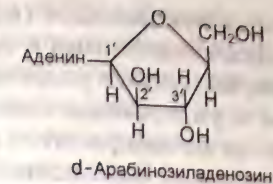
4.4. РОЛЬ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ И В ПАТОГЕНЕЗЕ ИММУНОДЕФИЦИТОВ

Аденозиндезаминаза (АДА), или аденозин-аминогидролаза (КФ 3.5.4.4.), — один из ключевых ферментов катаболизма пуриновых нуклеотидов. Обмен последних играет важную роль в функционировании разнообразных клеток организма человека. Особенно ярко значение метаболизма этих нуклеотидов проявляется в реализации функций клеток иммунной системы — Т- и В-лимфоцитов (созревание, апоптоз, иммунный ответ) и при их нарушениях (лейкозы, первичные и вторичные иммунодефициты). Соответственно при указанных физиологических или патологических процессах изменяется и активность АДА в лимфоцитах. АДА активна в разных клетках и тканях взрослых людей, но особенно в незрелых тимocyтах, в Т-лимфоцитах и несколько меньше в В-лимфоцитах. В периферических Т-лимфоцитах крови содержание АДА (при расчете на белок клетки) больше, чем в В-лимфоцитах, вследствие более активной транскрипции и замедленного распада молекул АДА.

АДА — олигомерный фермент с известной аминокислотной последовательностью. Катализирует дезаминирование эндогенных субстратов:



Фермент обладает лишь относительной специфичностью, катализирует также дезаминирование различных производных аденина, часть из которых является лекарственными (противоопухолевыми, противовирусными) препаратами: например, d-арабинозиладенозин и формицин. Именно поэтому для пролонгирования или усиления действия указанных противоопухолевых и противовирусных препаратов целесообразно использовать ингибиторы АДА.



Известно несколько изоферментов АДА: АДА₁ (мол. масса 40 000) и АДА₂ (мол. масса 110 000) с различным распределением в лимфоидных и нелимфоидных клетках и с разной чувствительностью к ингибиторам АДА, применяемым для лечения лейкозов. Последнее обстоятельство связано с тем, что при некоторых видах лейкозов у взрослых людей активность АДА в клетках увеличена. Аналогичное повышение активности АДА происходит в эритроцитах детей при синдроме Даймонда — Блекфена.

При генетическом (наследственном) дефекте АДА у детей в период до 2 лет проявляется тяжелый комбинированный иммунодефицит, связанный с нарушением созревания и пролиферации Т- и В-лимфоцитов, лимфопенией по обоим видам клеток, особенно по Т-лимфоцитам, слабым иммунным ответом на антиген (уменьшенное образование плазматических клеток), пониженным уровнем иммуноглобулинов в крови и увеличением содержания в крови аденозина и дезоксиаденозина. Дефект АДА выявляется во многих тканях, но патологические последствия развиваются главным образом в лимфоцитах. Недоразвиты тимус и лимфатические узлы. Дети, предрасположенные к бактериальным, вирусным и грибковым болезням, обычно умирают к 2-летнему возрасту в результате повреждения бронхолегочной системы, дисплазии костного мозга и других причин.

Молекулярный анализ показал, что наследственные дефициты АДА обусловлены рецессивными мутациями (замены и делеции нуклеотидов) в гене АДА, расположенном в 20-й хромосоме человека.

Механизм токсических и иммуносупрессивных эффектов при наследственных дефектах АДА заключается в следующем. Торможение реакций дезаминирования приводит к увеличению концентрации аденозина и дезоксиаденозина в клетках и крови. В результате этого увеличивается содержание аденило-

вых и дезоксиадениловых нуклеотидов (моно-, ди- и трифосфатов) и даже cAMP. Дезоксиаденозин и особенно dATP токсичны для лимфоцитов, вызывают угнетение активности рибонуклеотидредуктазы и уменьшение синтеза dNTP и ДНК. В других тканях в отличие от лимфоцитов активна фосфатаза dATP, которая предотвращает накопление dATP и соответственно последствия угнетения или дефицита АДА. Торможение образования дезоксиинозина и инозина и далее гипоксантина (субстрата для ксантиноксидазы) снижает продукцию активных форм кислорода, которые необходимы для нормального функционирования лимфоцитов и лейкоцитов. Активные формы кислорода накапливаются в результате побочных реакций, катализируемых ксантиноксидазой.

Для лечения комбинированного иммунодефицита может быть использована пересадка костного мозга при наличии соответствующих здоровых доноров или заместительная терапия препаратом АДА, конъюгированной с полиэтиленгликолем. В опытах на мышах получен определенный позитивный эффект генной терапии, заключающийся в трансформации собственных клеток костного мозга больных животных рекомбинантным ретровирусом с геном неповрежденной АДА с возвратом этих клеток в организм животных. Описаны первые попытки применения подобной генотерапии у больных детей.

Пуриннуклеозидфосфорилаза (ПНФ), или пуриннуклеозид: ортофосфат рибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.1.) — еще один фермент катаболизма пуриновых нуклеотидов. Катализирует реакции с эндогенными субстратами:

- 1) дезоксигуанозин + $H_3PO_4 \rightarrow$ гуанин + 2'-дезоксирибозо-1-фосфат;
- 2) гуанозин + $H_3PO_4 \rightarrow$ гуанин + рибозо-1-фосфат;
- 3) инозин + $H_3PO_4 \rightarrow$ гипоксантин + рибозо-1-фосфат.

Фермент активен во многих клетках человека, но его функции особенно существенны для Т-лимфоцитов. Интенсивность катализируемых ПНФ реакций очень высока в незрелых тимocyтах, снижается в периферических Т-лимфоцитах. У здоровых взрослых людей в Т-лимфоцитах ПНФ менее активна, чем АДА.

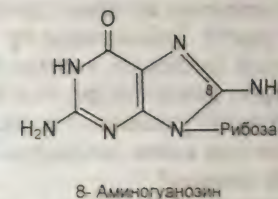
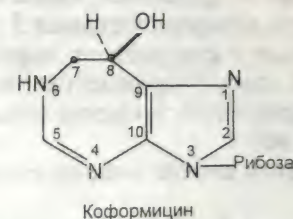
При наследственном (врожденном) дефекте ПНФ у детей во втором полугодии жизни или позже проявляется предрасположенность к различным инфекционным заболеваниям, связанная с ослаблением иммунитета. Нарушается созревание Т-лимфоцитов, уменьшается их концентрация в крови. Содержание В-лимфоцитов и иммуноглобулинов в крови существенно не изменяется. В клетках и крови увеличивается концентрация субстратов ПНФ и, что особенно важно, повышается концент-

рация токсического dGTP в Т-лимфоцитах и даже эритроцитах. Последнее может быть причиной анемий. Дефицит ПНФ проявляется в виде более легких заболеваний, чем дефицит АДА.

Основной механизм развития патологии связан с увеличением содержания дезоксигуанозина, гуанозина, инозина, токсичных для Т-лимфоцитов. В тимусных клетках и в периферических Т-лимфоцитах в отличие от других клеток активируется дезоксигуанозинкиназа, которая увеличивает содержание и dGTP. В В-лимфоцитах эта киназа малоактивна, поэтому уровень токсического dGTP существенно не изменяется или незначительно повышается.

Таким образом, наследственный дефект ПНФ уменьшает количество или изменяет функции Т-лимфоцитов, что приводит к нарушению Т-опосредованного (клеточного) компонента иммунитета.

Известны природные и химически синтезированные соединения, которые являются ингибиторами АДА [дезоксикоформин, коформин, эритро-9-(2-гидрокси-3-нонл)-аденин] и ПНФ (8-аминогуанозин, 8-аминогуанин).



Эти вещества могут быть использованы не только для прямого лечения лейкозов или усиления действия других противоопухолевых и противовирусных препаратов, но в перспективе и как иммунодепрессанты при пересадке органов либо при аутоиммунных заболеваниях. В настоящее время в практику трансплантологии внедрены другие иммунодепрессанты — ингибиторы инозинмонофосфатдегидрогеназы лимфоцитов, катализирующей одну из реакций синтеза GMP, а именно такие препараты, как мизорбин или брединин и эфиры микофеноловой кислоты.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ

1. В эксперименте животному вводили смесь аминокислот, содержащую орнитин с N^{15} в α -аминогруппе. В каких метаболитах орнитинового цикла окажется этот меченый атом?

- А. Цитруллин.
- Б. Аргинин.
- В. Мочевина.

Г. Аргининосукцинат.

Д. Аспартат.

2. В эксперименте животному вводили смесь аминокислот, содержащую орнитин с N^{15} в δ -аминогруппе. В каких метаболитах орнитинового цикла окажется этот атом азота?

А. Цитруллин.

Б. Аргининосукцинат.

В. Аргинин.

Г. Мочевина.

Д. Аспартат.

3. Цитруллинемия проявляется рвотой, нарушением сознания, судорогами.

А. Наследственный дефект какого из ферментов орнитинового цикла является причиной указанных нарушений?

1. Карбамоилфосфатсинтетаза I.

2. Орнитинкарбамоилфосфаттрансферазы.

3. Аргининосукцинатсинтетазы.

4. Аргининосукцинатлиазы.

5. Аргиназы.

Б. Почему использование в диете больших доз глутамата облегчает состояние больных с цитруллинемией?

4. При наследственном заболевании — аргининосукцинурии — суточная экскреция аргининосукцината почками достигает 3 г (в норме отсутствует). Заболевание протекает с судорогами, нарушением координации движений, аномалиями электроэнцефалограммы.

А. Дефект какого из ферментов орнитинового цикла может быть причиной указанных нарушений?

Б. В составе каких соединений в этом случае выводится эндогенный аммиак?

В. Почему добавление в пищу таким больным больших доз аргинина оказывает положительный эффект?

5. У новорожденного ребенка в возрасте 3 нед обнаружен высокий уровень фенилаланина в крови и фенилпирувата в моче.

А. Следует ли переводить этого новорожденного на диету, полностью лишенную фенилаланина, или только значительно снизить его содержание в пище?

Б. Когда нужно начинать лечение диетой?

1. В течение первого месяца жизни.

2. Через 6—12 мес.

3. При появлении симптомов ФКУ.

4. Не позже 9-летнего возраста.

5. В период полового созревания.

6. Больной поступил в клинику с приступом почечной колики. Слов больного известно, что у него периодически бывают приступы болей в большом пальце правой ноги. Результаты обследования: в крови — мочевая кислота — 9 мг/дл; в моче — мочевая кислота — 800 мг/сут. Дополнительные исследования позволили выявить снижение активности гуанингипоксантинфосфорибозилтрансферазы в крови.

Объясните причину обнаруженных у больного патологических симптомов. Скорость каких реакций обмена пуринов будет возрастать в этих условиях и почему?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Марри Р. и др. Биохимия человека. — Т. 2. — М.: Мир, 1993.

2. Медицинская газета, № 64, 1994 г.

3. Новый медицинский журнал, 1995, 1, с. 8—11.

4. Мусил Я. Основы биохимии патологических процессов. — М.: Медицина, 1985.

5. Робинсон М.В., Труфакин В.А. Ферменты пуринового обмена и жизнедеятельность иммунокомпетентных клеток//Успехи совр. биол. — 1993. — Т. 113. — № 3—4. — С. 82—94.

6. Alan Gaw et al. Clinical Biochem.//Churchill Livingstone, 1995.

7. Campbell P.N., Smit A.D. Biochemistry Illustrated//Churchill Livingstone, 1988.

8. Int. Ser. Chem. — 1989. — N 1. — P. 629—663.

9. Marks D.B. et al. Basic Medical. — USA, Pennsylvania: Williams & Wilkins, 1996.

В настоящей главе рассматриваются нарушения обмена, которые обусловлены врожденной недостаточностью специфических ферментов, участвующих в метаболизме углеводов. Клинические проявления подобных нарушений сильно варьируют и зависят от степени потери ферментом активности, а также от роли нарушенного метаболического пути в общей системе метаболизма. Все описываемые синдромы, за исключением недостаточности лактазы, встречаются сравнительно редко и наследуются по аутосомно-рецессивному типу.

5.1. НАРУШЕНИЕ ПЕРЕВАРИВАНИЯ ДИСАХАРИДОВ

Пищевые углеводы в основном представлены крахмалом, сахарозой и лактозой. Первые преобладают в пище взрослых людей, тогда как лактоза является основным углеводом в питании детей грудного возраста. Слюнные железы, поджелудочная железа и кишечный щеткообразный эпителий синтезируют ферменты (гликозидазы), катализирующие гидролитическое расщепление пищевых углеводов с образованием моносахаридов (рис. 5.1), которые затем транспортируются через плоский кишечный эпителий в воротную систему крови. Всасывание моносахаридов из кишечника (рис. 5.2) происходит путем облегченной диффузии с помощью специальных белков — переносчиков (транспортёров). Кроме того, глюкоза и галактоза транспортируются в энтероцит путем активного транспорта, зависящего от градиента концентрации ионов Na^+ . Белки-транспортёры, зависящие от градиента концентрации ионов Na^+ , обнаружены только в почках и кишечнике. Они обеспечивают перенос глюкозы в энтероцит против ее градиента концентрации, тогда как натрий освобождается в цитозоле по градиенту концентрации. Энергия, необходимая для этого активного транспорта, обеспечивается Na^+/K^+ -АТФазой, которая работает как насос, откачивая из клетки Na^+ в обмен на K^+ . В отличие от глюкозы и галактозы фруктоза транспортируется системой, не зависящей от ионов Na^+ . На этом основана возможность лечения синдрома нарушенного всасывания глюкозы и галактозы.

В основе патологии процесса переваривания углеводов ле-

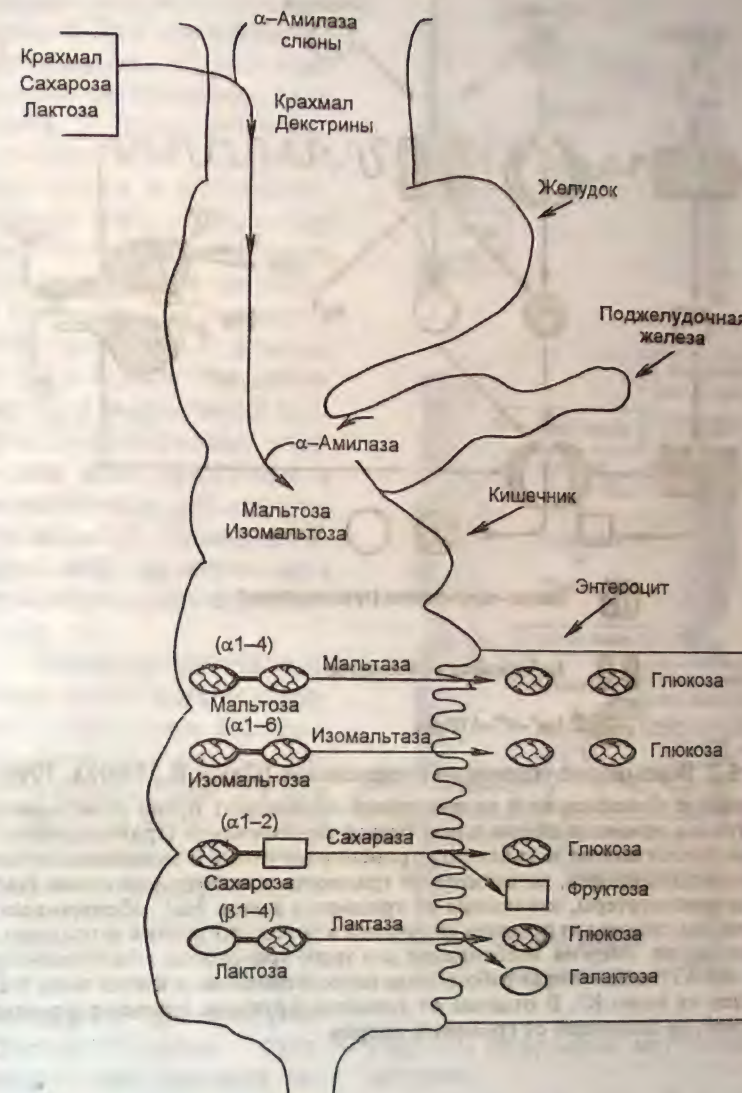


Рис. 5.1. Переваривание углеводов.

Крахмал частично переваривается в полости рта под действием амилазы слюны, расщепляющей $\alpha 1-4$ -гликозидные связи. Амилаза слюны инактивируется в желудке, так как оптимальное значение pH для ее активности составляет 6,7. Панкреатическая амилаза, расщепляющая $\alpha 1-4$ -гликозидные связи, продолжает гидролиз крахмала в тонкой кишке, способствуя образованию дисахаридов мальтозы и изомальтозы. Далее мальтоза и изомальтоза вместе с другими пищевыми дисахаридами гидролизуются специфическими гликозидазами на поверхности клеток кишечника (возможно, и внутри клеток) до соответствующих мономеров.

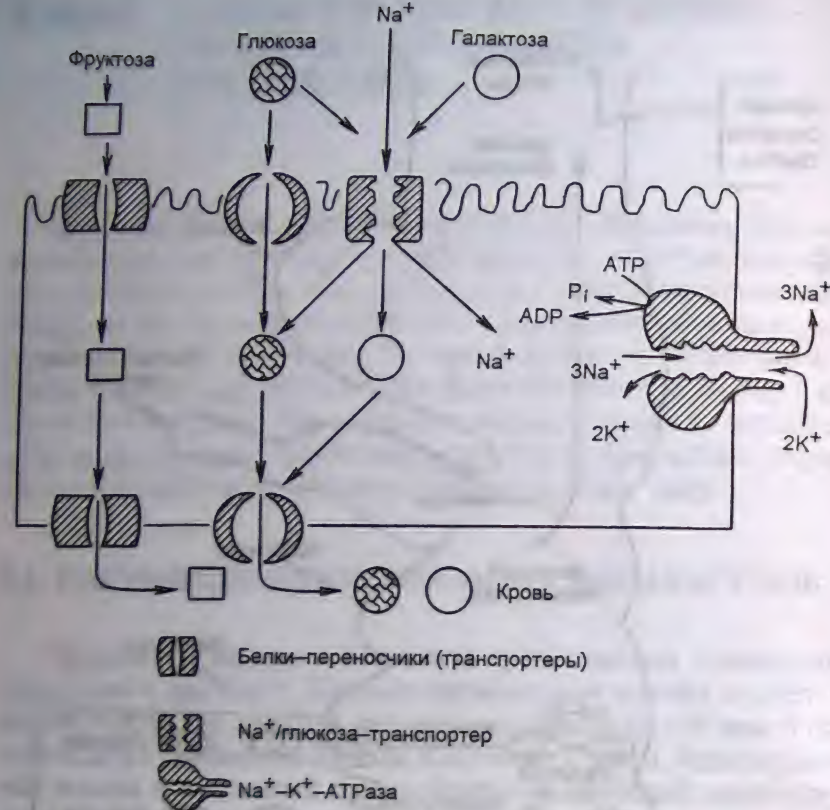


Рис. 5.2. Всасывание углеводов в кишечнике [Dawn B., Marks, 1996]. Всасывание моносахаридов из кишечника происходит путем облегченной диффузии с помощью специальных белков-переносчиков (транспортёров). Кроме того, глюкоза и галактоза транспортируются в энтероцит путем активного транспорта, зависящего от градиента концентрации ионов Na^+ . Белки-транспортёры, зависящие от градиента ионов Na^+ , обеспечивают всасывание глюкозы из просвета кишечника в энтероцит против ее градиента концентрации. Энергия, необходимая для этого транспорта, обеспечивается Na^+/K^+ -АТФазой, которая работает как насос, откачивая из клетки ионы Na^+ в обмен на ионы K^+ . В отличие от глюкозы фруктоза транспортируется системой, не зависящей от градиента натрия.

жат наследственные дефекты двух типов: 1) дефекты специфических ферментов, участвующих в гидролизе углеводов в кишечнике; 2) дефекты системы транспорта моносахарида через мембраны клеток кишечника. В том и другом случае возникает осмотическая диарея, потому что накопление в просвете кишечника непереваренных и невсосавшихся углеводов повышает осмолярность и, следовательно, вызывает приток воды в просвет кишечника. Более того, когда негидролизованные углеводы попадают в нижние отделы кишечника, они метабо-

лизируются бактериями с образованием кислот (рис. 5.3). Осмотическая активность образовавшихся органических анионов обуславливает дополнительное поступление воды в кишечник. Кроме того, в результате ферментативного расщепления углеводов микроорганизмами образуются газы (метеоризм), а также спазмы и боль в кишечнике. При выраженной диарее непереваренные углеводы обнаруживают в жидком кале, pH которого ниже 6,0. Примеры нарушений переваривания углеводов представлены в табл. 5.1.

Непереносимость лактозы может быть не связана с дефицитом лактазы. Клинические проявления этой формы такие же, как описаны в табл. 5.1. Без лечения заболевание протекает злокачественно с тяжелой диареей, рвотой, ацидозом, лактозурией. Часто возникают аминокацидурия, протеинурия. Отличительный признак — нормальная активность кишечной лактазы. При исключении лактозы из рациона симптомы исчезают. Биохимические основы этой формы болезни изучены недостаточно.

Для диагностики различных нарушений переваривания углеводов используют пробы с нагрузкой определенными углеводами (2 г углевода на 1 кг массы тела). После нагрузки в норме уровень моносахарида в крови увеличивается примерно на 50 мг/дл по сравнению с исходным. При патологии

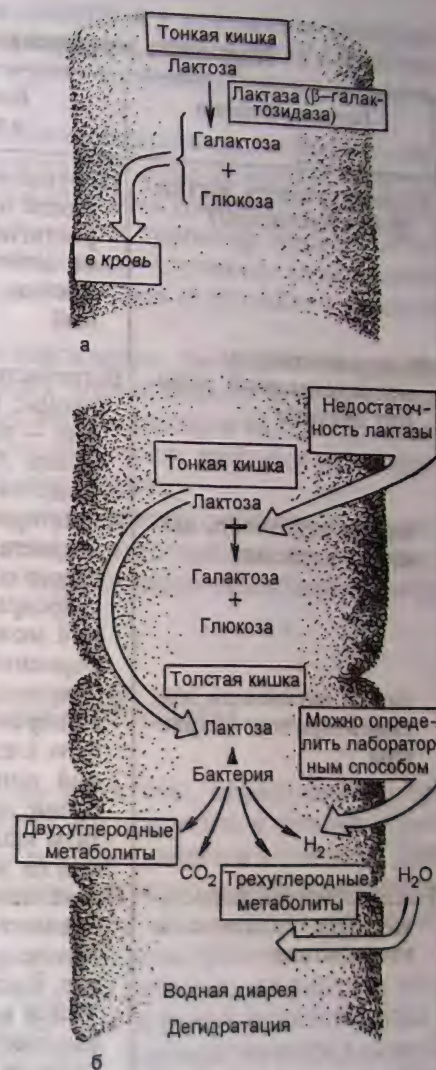


Рис. 5.3. Нарушение метаболизма лактозы.

а — нормальный метаболизм лактозы;
б — дефицит лактазы.

Нарушение переваривания дисахаридов

Причина болезни	Клинические проявления и лабораторные данные
Недостаточность лактазы (β -галактозидазы)	Нарушение толерантности к лактозе. После приема молока наблюдаются рвота, диарея, спазмы и боль в животе, метеоризм. С мочой выделяется лактоза, но это признак непостоянный
Формы патологии: наследственный дефицит лактазы	Встречается относительно редко. Симптомы: стойкая диарея и гипотрофия — развиваются сразу после рождения. Характерной особенностью является лактозурия
низкая активность лактазы у взрослых	Характерна также для детей старшего возраста. Является следствием возрастного снижения активности лактазы у предрасположенных лиц. Причиной может быть выключение гена фермента в онтогенезе
низкая активность лактазы вторичного характера	Это временная, приобретенная форма. Непереносимость молока может быть следствием кишечных заболеваний, например колитов, гастритов. Кроме того, временный дефицит лактазы может быть следствием операций на желудочно-кишечном тракте
Наследственная недостаточность сахаразы и изомальтазы	Проявляется, если в рацион детей добавляют сахарозу и крахмал. Больные дети обычно неохотно едят сладкое. После нагрузки сахарозой отмечается незначительный подъем гликемической кривой. Другие сахара: глюкоза, фруктоза, лактоза — переносятся хорошо

подъем гликемической кривой незначительный. Если тест при нагрузке моносахаридом сопровождается адекватным повышением его концентрации в крови, а нагрузка дисахаридом не дает нормальной реакции, то это, скорее всего, указывает на дефект кишечной дисахаридазы, а не системы транспорта моносахаридов.

Достаточно надежным диагностическим тестом для выявления недостаточности кишечной лактазы является тест с вдыханием водорода. В основе его лежит свойство бактерий ки-

шечника метаболизировать лактозу и в результате продуцировать водород. Количество лактозы, попадающей в толстую кишку, прямо коррелирует с количеством водорода, выделяемого легкими.

Нарушение всасывания моносахаридов может быть вызвано наследственным дефектом какого-либо компонента (белка или фермента), участвующего в системе транспорта через мембрану в кровоток. Фруктоза может транспортироваться без участия белков-переносчиков. В таких случаях отличительным признаком этой патологии может быть ее нормальное всасывание.

Клинически нарушение всасывания проявляется вздутием живота, болями после приема определенного углевода. При обследовании определяются кислая реакция кала, отсутствие повышения гликемической кривой после нагрузки углеводом. Позднее отмечается отставание в росте.

Положительная реакция на безлактозную диету позволяет подтвердить диагноз врожденной недостаточности лактазы и отличить эту патологию от нарушенного всасывания глюкозы и галактозы.

5.2. НАРУШЕНИЕ ОБМЕНА ФРУКТОЗЫ

Значительное количество фруктозы, образующееся при расщеплении сахарозы, прежде чем поступить в систему воротной вены, в клетках кишечника превращается в глюкозу. Другая часть фруктозы всасывается с помощью белка-переносчика, но возможен процесс всасывания и без участия переносчика путем диффузии по градиенту концентрации.

Метаболизм фруктозы (рис. 5.4) начинается с реакции фосфорилирования (реакция 1), катализируемой фруктокиназой с образованием фруктозо-1-фосфата. Фермент имеется в печени, обнаружен также в почках и кишечнике. Этот фермент обладает абсолютной специфичностью, поэтому в отличие от глюкокиназы на него не влияет инсулин. Это обстоятельство объясняет, почему скорость выведения фруктозы из крови у больных диабетом и здоровых не отличается. Фруктозо-1-фосфат не может превращаться во фруктозо-6-фосфат из-за отсутствия соответствующей мутазы. Вместо этого фруктозо-1-фосфат далее расщепляется фруктозо-1-фосфатальдолазой (реакция 2) на глицeroальдегид и диоксиацетонфосфат. В печени этот же фермент способен расщеплять и фруктозо-1,6-бисфосфат. Глицероальдегид может включаться в гликолиз после фосфорилирования с образованием глицeroальдегид-3-фосфа-

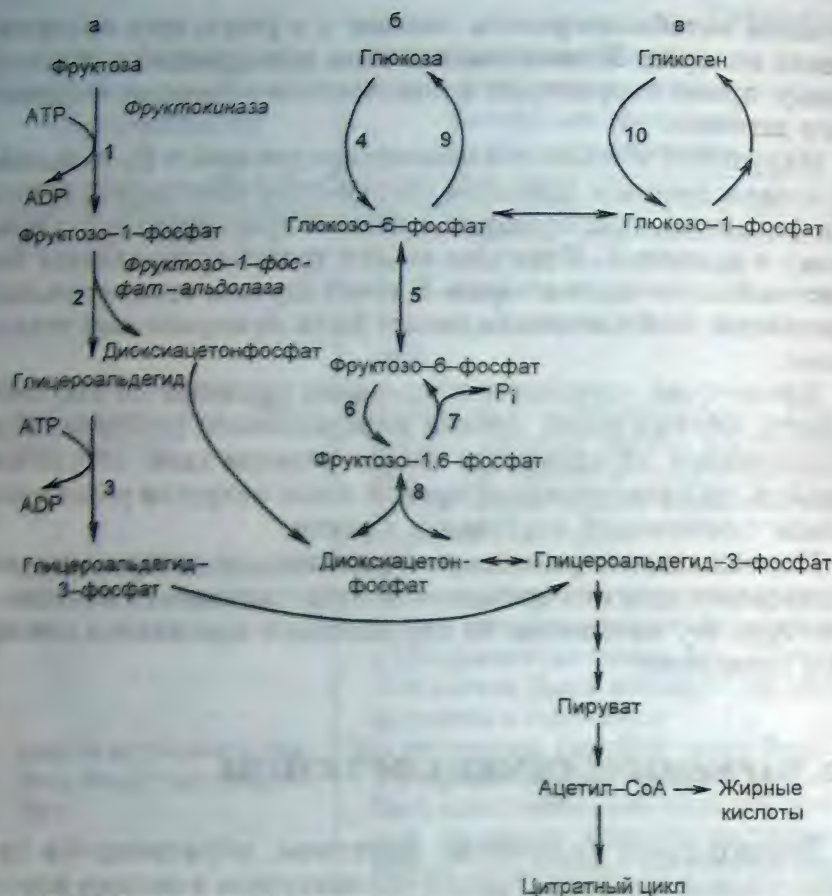


Рис. 5.4. Метаболизм фруктозы.

а — путь включения фруктозы в метаболизм; б — гликолиз; в — гликогенолиз.

та (реакция 3). Последняя реакция катализируется в печени триозокиназой. Две триозы либо включаются в гликолиз, либо конденсируются (реакция 8) и включаются в синтез глюкозы. Фруктоза в печени включается главным образом во второй путь.

Следует отметить, что включение фруктозы в метаболизм через фруктозо-1-фосфат минует стадию, катализируемую фосфофруктокиназой (реакция 6). Эта стадия является пунктом метаболического контроля скорости катаболизма глюкозы. Следовательно, катаболизм фруктозы короче, чем катаболизм глюкозы. Это объясняет, почему фруктоза ускоряет в печени процессы, ведущие к синтезу жирных кислот, а также их этерификацию с образованием триацилглицеринов, дальнейшую их упаковку в липопротеины очень низкой плотности (ЛОНП) и секрецию в кровоток.

Таблица 5.2

Нарушение метаболизма фруктозы

Неактивный фермент	Блокируемая реакция	Локализация фермента	Клинические проявления и лабораторные данные
Фруктокиназа	Фруктоза $\xrightarrow{ATP \rightarrow ADP}$ Фруктозо-1-фосфат	Печень, почки, кишечник	Фруктозурия, фруктоземия
Фруктозо-1-фосфатальдолоза	Фруктозо-1-фосфат $\xrightarrow{\text{Дикси-ацетонфосфат}}$ Глицероальдегид	Печень	Рвота, боли в животе, диарея, гипогликемия, гипотрофия, гипофосфатемия, фруктоземия, гиперурикемия, хроническая недостаточность функций печени, почек
Фруктозо-1,6-бисфосфатаза	Фруктозо-1,6-дифосфат $\xrightarrow{P_i}$ Фруктозо-6-фосфат	Печень	Те же, кроме прогрессирующей недостаточности функций печени, почек

Нарушение метаболизма фруктозы как следствие ферментативных дефектов отражены в табл. 5.2.

Недостаточность фруктокиназы клинически никак не проявляется. Фруктоза накапливается в крови и выделяется с мочой, где ее можно обнаружить лабораторными методами. Очень важно не перепутать эту безвредную аномалию с сахарным диабетом.

Наследственная непереносимость фруктозы, возникающая при генетически обусловленном дефекте фруктозо-1-фосфатальдолоазы, не проявляется, пока ребенок питается грудным молоком, т.е. пока пища не содержит фрукты, соки, сахарозу. Рвота, боли в животе, диарея, гипогликемия и даже кома и судороги возникают через 30 мин после приема пищи, содержащей фруктозу. У детей младшего возраста и подростков, продолжающих принимать фруктозу, развивается хроническая недостаточность печени и почек.

Нередко больные неохотно едят сладости. Подобный симптом может служить указателем на непереносимость того или иного углеводного компонента пищи.

Наблюдаемые симптомы могут объясняться снижением скорости глюконеогенеза, гликолиза и гликогенолиза (пути Б и В на рис. 5.4). Вероятно, фруктозо-1-фосфат, с одной стороны, ингибирует фосфорилазу (реакция 10) и тем самым тормозит гликогенолиз, а с другой — ингибирует альдолазу фруктозо-1,6-бисфосфата (реакция 8) и, следовательно, тормозит синтез глюкозы и ее распад. Ингибирование фосфорилазы гликогена приводит к гипогликемии, проявляющейся после приема пищи, содержащей фруктозу. Следствием торможения гликолиза и гликогенолиза является снижение синтеза АТР. Накопление фосфорилированной фруктозы — причина гипофосфатемии. Для пополнения внутриклеточного фосфора ускоряется распад адениловых нуклеотидов. Продукт распада этих нуклеотидов аденин включается в катаболизм, проходя стадии образования гипоксантина, ксантина и, наконец, мочевой кислоты. Увеличение количества мочевой кислоты проявляется как гиперурикемия.

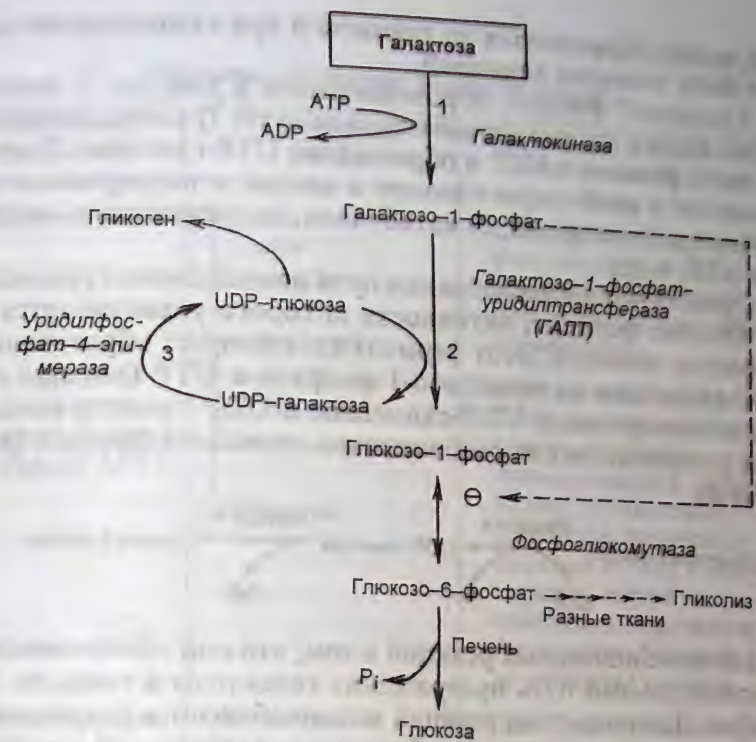
Непереносимость фруктозы, обусловленная дефектом фруктозо-1,6-бисфосфатазы (реакция 7), проявляется теми же симптомами. Этот фермент является ключевым в глюконеогенезе, поэтому неудивительно, что при отсутствии его активности развивается гипогликемия. При этом заболевании симптомы аналогичны перечисленным для предыдущей патологии, но они не прогрессируют до печеночной и почечной недостаточности; кроме того, больные не избегают сладкого.

Диагностика, нарушений метаболизма фруктозы основывается на следующих приемах: 1) наблюдение взаимосвязи между приемами пищи, содержащей фруктозу, и появлением клинических признаков; 2) определение в моче наличия фруктозы; 3) проба на толерантность к фруктозе. Для этого проводят анализ крови больного после нагрузки фруктозой (250 мг на 1 кг массы тела). При наличии дефекта фруктозо-1-фосфата альдолазы по анализу крови выявляют гипофосфатемию, гипогликемию (умеренную), гиперурикемию.

5.3. НАРУШЕНИЕ ОБМЕНА ГАЛАКТОЗЫ

Обмен галактозы особенно интересен в связи с наследственным заболеванием галактоземией.

Галактоза образуется в кишечнике в результате гидролиза лактозы. Включение галактозы в метаболизм происходит после того, как в печени галактоза превращается в глюкозу в ре-



Θ Ингибирование действия фермента

Рис. 5.5. Обмен галактозы.

зультате многостадийного АТР- и УТР-зависимого процесса. Путь превращения галактозы в глюкозу показан на рис. 5.5.

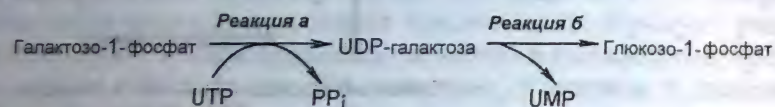
В реакции 1 галактоза фосфорилируется с участием галактокиназы и АТР. Образующийся галактозо-1-фосфат в реакции 2 взаимодействует с UDP-глюкозой и галактоза занимает место глюкозы в нуклеотиде, а глюкоза освобождается в виде глюкозо-1-фосфата. Реакцию катализирует фермент галактозо-1-фосфатуридилтрансфераза (ГАЛТ). Превращения галактозы в глюкозу (реакция 3) происходит в составе галактозосодержащего нуклеотида. Эта реакция катализируется эпимеразой NAD-зависимым ферментом, который катализирует окисление и восстановление по 4-му углеродному атому.

Эпимераза может работать и в другом направлении, преобразуя UDP-глюкозу в UDP-галактозу. Эта обратная эпимеризация важна для синтеза галактозилных остатков в гликолипидах и гликопротеинах. Кроме того, галактоза необходима для синтеза лактозы в молочных железах. Следовательно, галактоза не является незаменимым компонентом пищи, так

как может образоваться из глюкозы и при галактоземии может быть заменена глюкозой.

Глюкозо-1-фосфат, образовавшийся в реакции 2, может включаться в разные метаболические пути: 1) синтез гликогена после реакции с UTP и образование UTP-глюкозы; 2) превращение в свободную глюкозу в печени и поддержание ее концентрации в крови; 3) катаболизм, сопряженный с синтезом АТФ, и т.д.

Существуют альтернативные пути использования галактозы. Описан фермент, активность которого увеличивается с возрастом человека. Этот фермент катализирует образование UDP-галактозы из галактозо-1-фосфата и UTP (реакция а). После изомеризации UDP-галактозы в UDP-глюкозу последняя расщепляется с высвобождением глюкозо-1-фосфата (реакция б):



Значение описанных реакций в том, что они обеспечивают дополнительный путь превращения галактозы в глюкозо-1-фосфат. Наличием этих реакций можно объяснить повышение резистентности к галактозе у больных галактоземией с возрастом.

Галактоземия — это результат нарушения обмена галактозы, обусловленное наследственным дефектом любого из трех ферментов, включающих галактозу в метаболизм (табл. 5.3).

Галактоземия вследствие недостаточности галактозил-1-фосфат-уридилтрансферазы (ГАЛТ) известна наиболее хорошо. Заболевание проявляется очень рано, особенно тяжело протекает у детей, так как основным источником углеводов служит грудное молоко, содержащее лактозу. Ранними симптомами являются рвота, диарея, дегидратация, снижение массы тела, желтуха. Они появляются вскоре после рождения, как только ребенок начинает получать молоко.

В крови, моче и тканях повышается концентрация галактозы и галактозо-1-фосфата. В тканях глаза (в хрусталике) галактоза восстанавливается алдольредуктазой с образованием галактитола (дульцит). В качестве донора водорода в этой реакции используется $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Восстановление галактозы характерно и для нормального метаболизма, но протекает с небольшой скоростью. При галактоземии галактитол накапливается в стекловидном теле и связывает большое количество воды. Нарушается баланс электролитов, а чрезмерная гидратация хрусталика приводит к развитию катаракты, которая наблюдается уже через несколько дней после рождения. Ката-

Таблица 5.3

Примеры нарушения обмена галактозы

Дефектный фермент	Блокируемая реакция	Клинические проявления и лабораторные признаки
Галактокиназа	$ \begin{array}{c} \text{Галактоза} \\ \downarrow \text{АТФ} \rightarrow \text{АДР} \\ \text{Галактозо-1-фосфат} \end{array} $	Галактоземия, галактозурия, нарушение зрения, катаракта. Активность фермента в эритроцитах нормальная
Галактозо-1-фосфатуридилтрансфераза (ГАЛТ)	$ \begin{array}{c} \text{Галактозо-1-фосфат} \\ \downarrow \text{UDP-глюкоза} \rightarrow \text{Глюкозо-1-фосфат} \\ \text{UDP-галактоза} \end{array} $	Галактоземия, галактозурия, галактозо-1-фосфатемия, катаракта. Аминоацидурия, протеинурия, тирозинемия (следствие нарушения функции почек). Гепатомегалия, задержка психического развития. Активность фермента в эритроцитах снижена
Уридилфосфат-4-эпимераза	$ \begin{array}{c} \text{UDP-галактоза} \\ \downarrow \\ \text{UDP-глюкоза} \end{array} $	Галактоземия, галактозурия. Тяжелых клинических проявлений нет. Описаны единичные случаи заболевания

ракта может быть обнаружена только с помощью специальных методов и не определяется при помощи простого офтальмоскопа.

Серьезные изменения наблюдаются в печени в связи с накоплением галактозо-1-фосфата. Нарушается функция печени: отмечаются гепатомегалия, жировая дистрофия, околodольчатый некроз. В почках у таких больных повышена концентрация галактитола и галактозо-1-фосфата, что нарушает их функции. Выявляются нарушения в клетках полушарий большого мозга и мозжечка, в тяжелых случаях — отек мозга, задержка умственного развития; возможен летальный исход.

Для галактоземии вследствие дефекта галактокиназы также характерна катаракта, но при этом не отмечаются нарушения функции печени, почек, мозга. Наиболее тяжелые последствия дефицита ГАЛТ связывают с влиянием галактозо-1-фосфата на активность других ферментов, участвующих в углеводном обмене.

Известно несколько форм галактоземии, причиной которой

Некоторые варианты генетического дефекта ГАЛТ

Изменения в структуре ГАЛТ	Проявления
Аси 314 Асп	Признак Дюарта. Гетерозиготы для этого варианта мутаций имеют около 75 % от нормальной активности фермента. Гомозиготный фенотип Дюарта обычно связан с 50 % потерей активности. Пациенты с синдромом Дюарта могут быть здоровыми несмотря на структурную аномалию ГАЛТ
Гли 188 Арг	Проявляется как тяжелая галактоземия. Причиной является мутация в нуклеотиде 591-го гена фермента. Активность ГАЛТ составляет 10 % от нормы. Эта форма наблюдается у 70 % больных галактоземией среди кавказского населения, где заболевание встречается в соотношении 1:338 886
Сер 319 Лей	Заболевание описано у чернокожих пациентов и названо «черный признак». Галактоземия проявляется как результат недостаточной активности ГАЛТ в печени и эритроцитах. Активность ГАЛТ в печени составляет 10 % от нормы. Тем не менее отмечалась утилизация некоторого количества галактозы, что объяснялось развитием альтернативного пути. Причина — мутация (типа замены) в 1158-м нуклеотиде гена фермента.
Арг 333 Три	Тяжелая форма галактоземии. Причина — мутация в 1025-м нуклеотиде гена фермента. Активность ГАЛТ отсутствует
Лиз 285 Аси	Является широко распространенной мутацией при галактоземии

является недостаточность ГАЛТ. Некоторые варианты генетических дефектов ГАЛТ приведены в табл. 5.4.

Отдельные дефекты в строении ГАЛТ приводят лишь к частичной потере активности фермента. Как правило, ГАЛТ присутствует в организме в избыточном количестве, поэтому снижение ее активности до 50 %, а иногда и ниже может клинически не проявляться. Кроме того, при дефекте ГАЛТ в печени и эритроцитах, но достаточной активности эпимеразы возможен синтез UDP-галактозы из глюкозы по альтернативному пути. Это объясняет, почему дети с такой формой заболевания живут и растут на безгалактозной диете. В то же время они могут отставать в развитии, что объясняется токсическим действием галактозы в раннем возрасте.

Для диагностики галактоземии исследуют мочу на содержание галактозы, собранную после нескольких кормлений молоком. При обнаружении у ребенка катаракты необходимо провести анализы на недостаточность галактокиназы и ГАЛТ. Наличие галактозы в моче при отсутствии нарушений функции печени указывает на дефект галактокиназы. Следует отметить, что активность галактокиназы в эритроцитах в этом случае сохраняется. Проведение теста с нагрузкой галактозой не рекомендуется, так как этот тест опасен для больных.

Лечение заключается в удалении галактозы из рациона. При ранней диагностике это дает хорошие результаты. Следует отметить, что в международном обзоре долгосрочных результатов лечения галактоземии сообщается о выявленных 350 неудовлетворительных случаях лечения несмотря на раннюю диагностику и достаточную диетотерапию. В это число вошли случаи, когда матери во время беременности находились на безгалактозной диете.

5.4. ГЛИКОГЕНОВЫЕ БОЛЕЗНИ

Прежде чем рассматривать болезни, связанные с нарушением обмена гликогена, необходимо представить его основные метаболические пути и способы их регуляции, чтобы оценить нарушения в зависимости от значимости этих метаболических путей.

Гликоген является депонированной формой глюкозы и откладывается преимущественно в печени и мышцах. При полимеризации глюкозы в гликоген достигается эффект снижения растворимости и исключается влияние на осмотическое давление в клетке, что обеспечивает возможность накопления гликогена. Строение гликогена в виде разветвленной структуры делает его легкодоступным для ферментов, которые отщепляют мономеры при его распаде или присоединяют мономеры при его синтезе. Некоторые ферменты сами связаны с гликогеновыми гранулами, что облегчает доступ к субстрату. Основные пути метаболизма гликогена представлены на рис. 5.6.

Регуляция обмена гликогена в печени и мышцах осуществляется таким образом, чтобы включался либо его синтез, либо распад в зависимости от состояния пищеварения (характерно депонирование глюкозы) на мобилизацию ее запасов в постабсорбтивном периоде. Переключение этих метаболических путей контролируется гормонами: инсулином, глюкагоном (в печени) и адреналином. Влияние гормонов осуществляется путем изменения в противоположном направлении активнос-



Рис. 5.6. Синтез и распад гликогена.

1, 2, 3, 4, 5 — реакции синтеза гликогена; 6, 7, 8 — реакции распада гликогена.

ти двух ключевых ферментов: гликогенсинтазы и гликогенфосфорилазы — с помощью их фосфорилирования и дефосфорилирования.

Решающим для переключения метаболизма гликогена в печени является соотношение концентраций инсулина и глюкагона в кровотоке, изменяющееся при смене состояния организма. В постабсорбтивном периоде отношение инсулин/глюкагон снижается и решающим является влияние глюкагона, который стимулирует распад гликогена в печени. Механизм действия глюкагона показан на рис. 5.7.

В период пищеварения преобладающим является влияние инсулина (отношение инсулин/глюкагон высокое). Фосфорилированные ферменты дефосфорилируются, а в этом состоянии гликогенсинтаза активна. Глюкокиназа печени обладает наибольшей активностью ($K_m = 10$ ммоль/л), потому что концентрация глюкозы в воротной вене в этот период 10—12 ммоль/л. Следовательно, синтез гликогена в печени ускоряется. Потребление глюкозы мышечными клетками в этот период также увеличивается под влиянием инсулина, который вызывает перемещение белков-транспортеров, глюкозы из цитозоля в плазматическую мембрану и, следовательно, переход

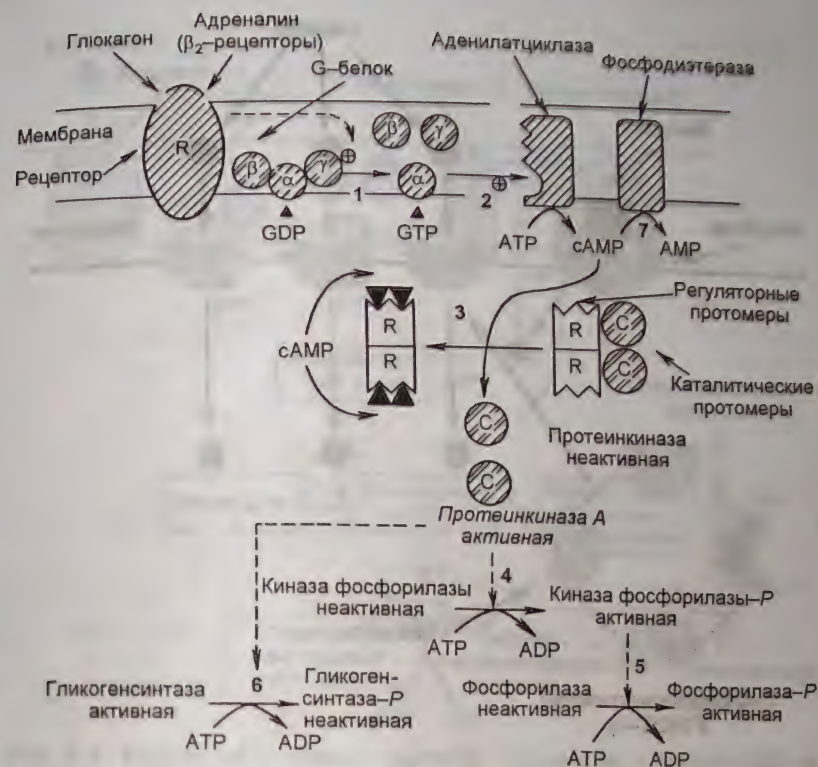
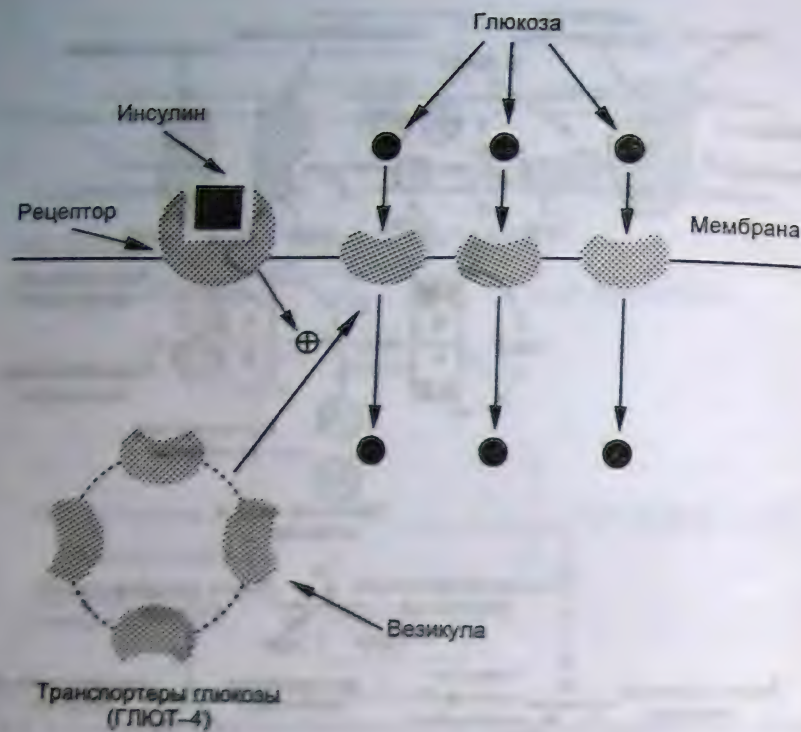


Рис. 5.7. Регуляция синтеза и распада гликогена в печени глюкагоном и адреналином.

1 — глюкагон и адреналин взаимодействуют со специфическими мембранными рецепторами. Комплекс гормон—рецептор влияет на конформацию G-белка, вызывая диссоциацию его на протомеры и замену в α -субъединице GDP на GTP; 2 — α -субъединица, связанная с GTP, активирует аденилатциклазу, которая катализирует синтез cAMP из ATP; 3 — в присутствии cAMP протеинкиназа (cAMP-зависимая) обратимо диссоциирует, освобождая обладающие каталитической активностью субъединицы C; 4 — протеинкиназа активирует киназу фосфорилазы путем фосфорилирования; 5 — киназа фосфорилазы фосфорилирует гликогенфосфорилазу, превращая ее в активную гликогенфосфорилазу; 6 — протеинкиназа фосфорилирует также гликогенсинтазу, переводя ее в неактивное состояние. В результате ингибирования гликогенсинтазы и активирования гликогенфосфорилазы гликоген включается в процесс распада; 7 — фосфодиэстераза катализирует распад cAMP и тем самым прекращает действие гормонального сигнала. Комплекс α -субъединица — GTP затем самонактивируется за счет энергии распада GTP и реассоциации α -, β - и γ -субъединиц G-белка.

глюкозы из кровотока в мышечную клетку и далее в гликоген (рис. 5.8).

Адреналин, так же как глюкагон, может стимулировать в печени распад гликогена. Существует несколько типов мембранных рецепторов адреналина. Для клеток печени характер-



⊕ Стимуляция инсулином перемещения белков

Рис. 5.8. Стимуляция инсулином перемещения транспортеров глюкозы из цитоплазмы в плазматическую мембрану.

ны рецепторы типа α , и β . Тип рецептора, с которым взаимодействует адреналин, определяет эффекторную систему передачи гормонального сигнала в клетку. Так, взаимодействие адреналина с β -рецепторами клеток печени приводит в действие аденилатциклазную регуляторную систему, результатом чего являются активация сАМР-зависимой протеинкиназы и фосфорилирование ключевых ферментов (см. рис. 5.7). Взаимодействие адреналина с α -рецепторами также приводит к активации киназы фосфоорилазы гликогена, но с участием инозитоллипидного механизма трансмембранной передачи гормонального сигнала (рис. 5.9).

В мышцах переключение метаболизма гликогена происходит главным образом при смене состояния покоя на режим мышечной работы, которая может совершаться вне зависимости от еды.

Активация адреналином мышечной гликогенфосфоорилазы

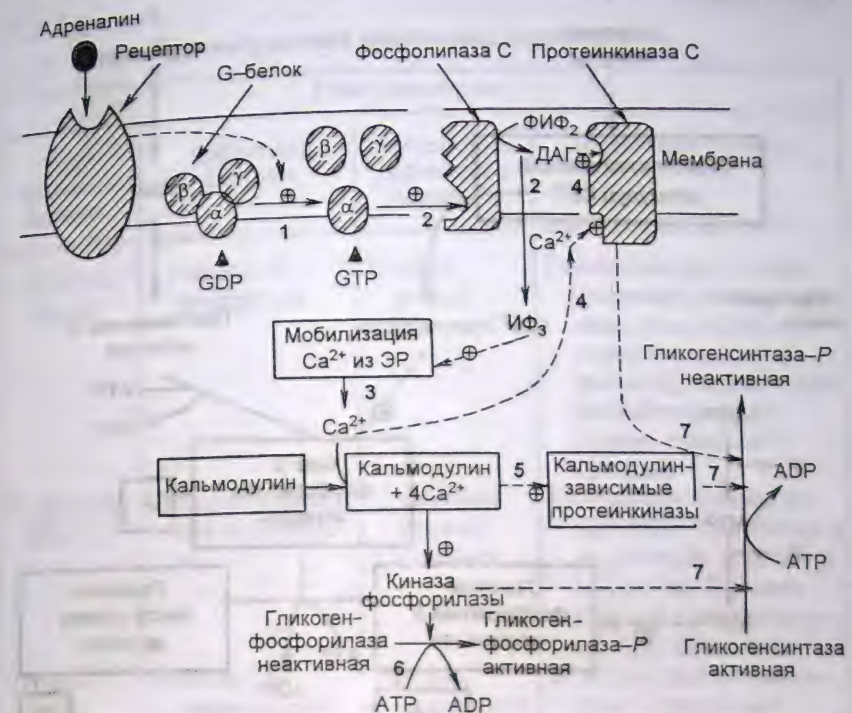


Рис. 5.9. Регуляция синтеза и распада гликогена в печени адреналином и ионами Ca^{2+} .

ФИФ₂ — фосфатидилинозитолбисфосфат; ИФ₃ — инозитол-1,4,5-трифосфат; ДАГ — диацилглицерин; ЭР — эндоплазматический ретикулум; 1 — взаимодействие адреналина с α -рецептором трансформирует сигнал через активацию G-белка на фосфолипазу C, переводя ее в активное состояние; 2 — фосфолипаза C гидролизует ФИФ₂ на ИФ₃ и ДАГ; 3 — ИФ₃ активирует мобилизацию ионов Ca^{2+} из ЭР; 4 — ионы Ca^{2+} и ДАГ активируют протеинкиназу C, которая фосфорилирует гликогенсинтазу, переводя ее в неактивное состояние; 5 — комплекс 4Ca^{2+} /кальмодулин активирует киназу фосфоорилазы и кальмодулинзависимые протеинкиназы; 6 — киназа фосфоорилазы фосфорилирует гликогенфосфоорилазу и тем самым активирует ее; 7 — активные формы трех киназ (кальмодулинзависимая протеинкиназа, киназа фосфоорилазы и фосфолипаза C) фосфорилируют гликогенсинтазу в различных центрах, переводя ее в неактивное состояние

осуществляется несколько иначе, так как распад гликогена в скелетных мышцах инициируется мышечными сокращениями и импульсами нервной системы. Результатом действия адреналина также являются активация сАМР-зависимых протеинкиназ и фосфорилирование гликогенфосфоорилазы (рис. 5.10).

Гликогеновые болезни — это группа наследственных болезней, причиной которой является энзимдефект и, следовательно, снижение или отсутствие активности какого-либо фермента, участвующего в синтезе или распаде гликогена либо регуляции этих ферментов.

Характеристика некоторых гликогенозов

Гликогенозы			
Тип, название болезни	Дефектный фермент	Локализация дефектного фермента	Проявления болезни
I. Болезнь Гирке	Глюкозо-6-фосфатаза	Печень, почки	Гипогликемия, гиперурикемия, гиперлипемия, ацидоз (вследствие накопления лактата), характерное выражение лица («лицо китайской куклы»)
II. Болезнь Помпе	Лизосомальная α -глюкозидаза	Лизосомы многих органов	Генерализованное накопление гликогена в лизосомах, а затем в цитозоле. Болезнь быстро прогрессирует, прогноз плохой
III. Болезнь Фобса	Амило-1,6-глюкозидаза (деветвящий фермент)	Печень, скелетные мышцы, сердце	Накапливается гликоген с короткими внешними ветвями (лимитодекстрин). Остальные проявления такие же, как при I типе
IV. Болезнь Андерсена	Амило-1,4,1,6-глюкозидаза (ветвящий фермент)	Печень	Накапливается структурно измененный гликоген с очень длинными наружными ветвями и редкими точками ветвления, сопровождается циррозом печени с желтухой и печеночной недостаточностью
V. Болезнь Мак-Ардла	Мышечная гликогенфосфорилаза	Скелетные мышцы	Боли в мышцах после физической нагрузки (даже умеренной). Откладывается гликоген нормальной структуры. Энергетические потребности мышц обеспечиваются окислением жир-

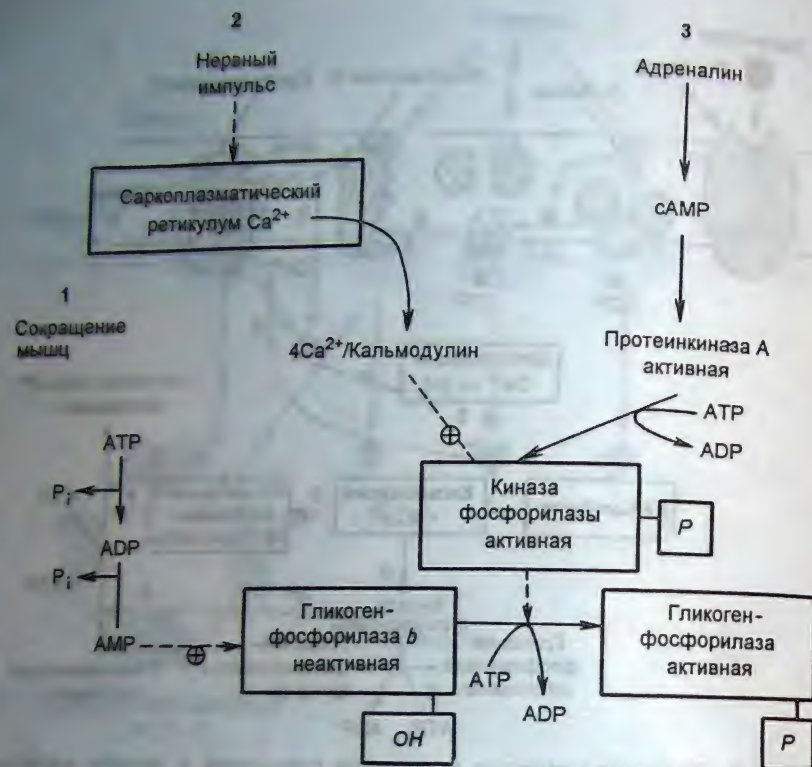


Рис. 5.10. Активация гликогенфосфорилазы мышц.

1 — аллостерическая активация гликогенфосфорилазы *b*. В процессе мышечного сокращения происходит деградация АТФ с образованием АМР, который является аллостерическим активатором гликогенфосфорилазы *b*; 2 — нервный импульс инициирует освобождение ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума. Ион Ca^{2+} образует комплекс с кальмодулином, способный активировать кинезу фосфорилазы; 3 — путь активации гликогенфосфорилазы адреналином.

Гликогенозы — заболевания, обусловленные дефектом ферментов, участвующих в распаде гликогена, и проявляющиеся необычной структурой гликогена или его избыточным накоплением в печени, сердечной и скелетных мышцах, почках, легких и других органах. В табл. 5.5 описаны некоторые типы гликогенозов, различающиеся характером и локализацией энзимдефекта.

Гликогеноз I типа (болезнь Гирке) встречается наиболее часто. Описание причин разнообразных симптомов этого типа гликогеноза дает основание для понимания симптомов всех остальных типов. Болезнь Гирке обусловлена наследственным дефектом глюкозо-6-фосфатазы, обеспечивающей выход глюкозы в кровоток после ее освобождения из гликогена в печени и почках. Результатом дефекта глюкозо-6-фосфатазы яв-

Гликогенозы			
Тип, название болезни	Дефектный фермент	Локализация дефектного фермента	Проявления болезни
VI. Болезнь Херса	Фосфорилаза печени	Печень	ных кислот, поэтому после мышечных сокращений увеличения лактата в сыворотке крови не наблюдается Средняя гипогликемия, гепатомегалия, клинические проявления похожи, но менее выражены, чем при гликогенозах I и III типов
IX	Киназа фосфорилазы	»	Такие же, как при VI типе
X	Протеинкиназа А (сАМР-зависимая)	»	То же
VII	Мышечная фосфофруктокиназа	Мышцы	Такие же, как при V типе

яется гипогликемия. Глюкозо-6-фосфат вовлекается в гликолиз и в результате продуцируется лактат. В крови повышается количество лактата и пирувата; возможен ацидоз. После введения адреналина или глюкагона можно наблюдать гиперлактатемию, но не гипергликемию, так как образование свободной глюкозы невозможно. Результатом гипогликемии могут быть судороги.

Гипогликемия сопровождается уменьшением содержания инсулина и снижением отношения инсулин/глюкагон, что в свою очередь ведет к ускорению липолиза в жировой ткани и выходу в кровь жирных кислот.

Результатом гликолиза в печени является также образование $\text{NADH} + \text{H}^+$ в реакции окисления 3-фосфоглицеринового альдегида в 1,3-бисфосфоглицериновую кислоту и использование $\text{NADH} + \text{H}^+$ для восстановления диоксиацетонфосфата в α -глицерофосфат, который затем включается в синтез триацилглицеринов.

Выделяют две предполагаемые причины гиперглицерине-

мии: гиперпродукцию ЛОНП печенью и снижение активности липопротеинлипазы (фермент активируется инсулином). Ацидоз обусловлен накоплением молочной кислоты, а не кетонных тел. Избыток пирувата, по-видимому, либо карбоксилируется с образованием оксалоацетата, который далее окисляется, либо декарбоксилируется в ацетил-СоА. Накопление ацетил-СоА сопровождается повышением синтеза малонил-СоА, оказывающим тормозящее действие на кетогенез.

Гиперурикемия объясняется, во-первых, ускорением катаболизма нуклеотидов и, во-вторых, снижением уровня экскреции уратов. Первая причина, так же как при нарушении обмена фруктозы, — снижение уровня внутриклеточного фосфора и поэтому усиление деградации нуклеотидов. Снижение экскреции уратов обусловлено тем, что при данной патологии продукция лактата увеличена, что приводит к снижению pH мочи, а это затрудняет выведение уратов.

При диагностике данной патологии определяют активность глюкозо-6-фосфатазы в биоптатах печени. Кроме того, используют тест со стимуляцией глюкагоном. Этот тест дает отрицательный результат, т.е. при введении глюкагона повышения уровня глюкозы в крови не отмечается. Внутривенное введение фруктозы и галактозы тоже не сопровождается повышением гликемической кривой, потому что эти моносахара в конечном итоге превращаются в глюкозо-6-фосфат, а при отсутствии активности фосфатазы глюкоза в кровь не освобождается.

Лечение состоит в ограничении употребления продуктов, содержащих глюкозу. Рекомендуются не употреблять продукты, содержащие сахарозу и лактозу, так как образующиеся из них галактоза и фруктоза после превращения в глюкозо-6-фосфат способствуют дальнейшему накоплению гликогена. Для облегчения состояния используют метод постоянного кормления в течение ночи. Этим можно предупредить осложнение гипогликемии и несколько уменьшить размеры печени.

Агликогеноз — заболевание, развивающееся при наследственном дефекте гликогенсинтазы. В печени наблюдается почти или полное отсутствие гликогена. Это сопровождается резко выраженной гипогликемией между приемами пищи. Характерные симптомы — судороги, проявляющиеся особенно по утрам.

Для диагностики важно отсутствие гликогена в биоптатах и выраженная гипогликемия (0,4—0,7 ммоль/л).

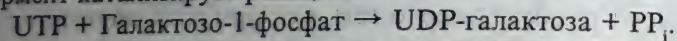
Резкую гипогликемию и судороги можно ослабить частым кормлением ночью.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ

1. У ребенка 2 лет, перенесшего инфекционный энтерит, после еды появляются рвота, диарея, боли в животе. После исключения молока из пищи симптомы исчезли. Выберите возможную причину заболевания

- А. Наследственный дефект панкреатической амилазы.
- Б. Наследственный дефект сахаразы.
- В. Наследственный дефект лактазы.
- Г. Приобретенный дефицит лактазы.

2. У ребенка, имеющего генетический дефект ГАЛТ, к 5 годам развилась адаптация к галактозе, т.е. способность метаболизировать галактозу с помощью фермента UDP-галактопирифосфорилазы. Этот фермент катализирует реакцию:



Каким образом происходит дальнейший метаболизм галактозы? Напишите схемы этих метаболических путей.

3. Какое биологическое значение имеет разветвленное строение гликогена?

4. На чем может быть основан способ количественного определения точек ветвления в молекуле гликогена? Что происходит с остатками глюкозы в точках ветвления?

5. При исследовании биоптата печени больного с генетическим дефектом одного из ферментов обмена гликогена обнаружили следующее:

- 1) происходит синтез глюкозо-6-фосфата из лактата;
- 2) не происходит синтеза гликогена из глюкозы, фруктозы и галактозы;
- 3) гликоген может распадаться с образованием глюкозо-6-фосфата.

Какой из перечисленных ферментов был дефектным?

- А. Гликогенфосфорилаза.
- Б. Фруктозодифосфатаза.
- В. UDP-глюкопирифосфорилаза.
- Г. Фосфоглюкомутаза.

6. Известны заболевания, обусловленные разного рода дефектами фосфофруктокиназы печени:

- 1) изменением аллостерического центра, приводящим к нарушению взаимодействия его с цитратом; вследствие этого снижается тормозящее действие цитрата на активность фермента;
- 2) изменением каталитического центра, приводящим к снижению активности фермента.

В каком из этих случаев будет наблюдаться гликогеноз?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Пузырев В.П. Медицинские аспекты экогенетики//Соросовский образовательный журнал. — 1997. — № 8.

2. Allen R.J. et al. Neurological outcome of neonatal galactosemia before and after newborn screening. Proceedings: Tenth National Neonatal Screening Symposium, 1994.

3. Dawn B., Marks Ph.D., Allan D. Marks et al. Basic medical biochemistry. — Baltimore: Williams Wilkins, 1996.

4. Fineman R.M., Glass M.W. Galactosemia: to screen or not to screen? Proceeding: Tenth National Screening Symposium, 1994.

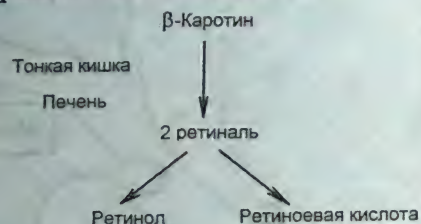
5. Pamela C. Champl, Richard A. Harvey. Lippincott's illustrated Reviews: Biochemistry J.B. Lippincott company. — Philadelphia, 1994.

6. Thomas M., Devlin Ph.D. Textbook of Biochemistry. — New York, 1992.

7. Waggoner D.D., Buist N.R.M., Donnel G.N. Long term prognosis in galactosemia; results of a survey of 350 cases//J. Ing. Met. Dis. — 1991. — Vol. 13. — P. 802—818.

6.1. ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ: ФУНКЦИИ, БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ГИПОВИТАМИНОЗОВ

Витамин А. Источники витамина А — животные жиры, рыбий жир. В растениях содержится β -каротин, который в организме превращается в витамин А.



Ретинол и ретиналь в организме взаимопревращаются. Ретиналь входит в состав белка родопсина и участвует в акте восприятия энергии светового луча, при этом происходит превращение *цис*-формы ретиналя в *транс*-форму и он отделяется от белка родопсина. Изменение конформации белка приводит к закрытию натриевых каналов в мембранах клеток-палочек, гиперполяризации мембраны, в результате чего возникает нервный импульс. Дефицит витамина А вызывает снижение чувствительности к восприятию света, особенно в сумерках (куриная слепота). Кроме того, витамин А участвует и в других процессах: эпителизации и формировании ткани костей и зубов. При дефиците витамина А наблюдаются сухость роговицы и конъюнктивы (ксерофтальмия), поражение эпителия дыхательных путей и в итоге снижение устойчивости к инфекциям, нарушение структуры костей ткани, уменьшение толщины зубной эмали.

Витамин D₃. Источники витамина D₃ — молоко, масло, печень; под действием УФ-лучей в организме происходит один из этапов синтеза витамина D₃ из холестерина.

В организме витамин D₃ превращается в гормон кальцитриол, регулирующий обмен кальция и фосфатов, поэтому наиболее выраженным симптомом дефицита витамина D₃ является рахит.

Витамин К. Этот витамин содержится в капусте, других растениях, в яичном желтке, печени. В кишечнике витамин К синтезируется под действием бактерий, что в норме обеспечивает половину суточной потребности в нем.

Витамин К как кофермент участвует в реакциях синтеза ряда факторов свертывания крови, в которых происходит присоединение дополнительной карбоксильной группы к радикалу глутаминовой кислоты. Эти отрицательно заряженные

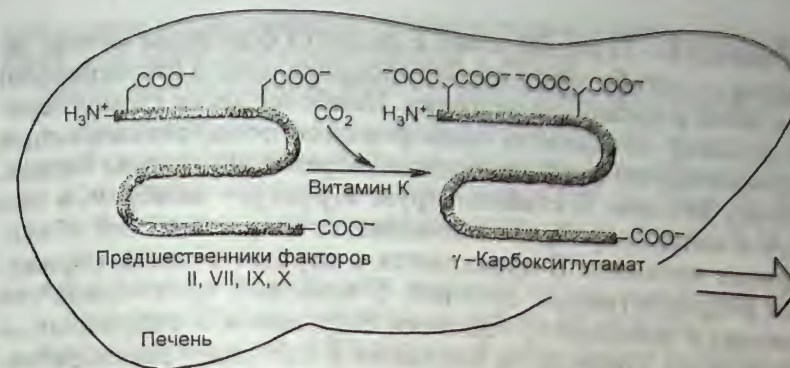


Рис. 6.2. Роль витамина К в активации факторов свертывания крови.

группы необходимы для активации факторов II, VII, IX, X при взаимодействии их с фосфолипидами мембран тромбоцитов (рис. 6.2).

Дефицит витамина К наблюдается редко, однако при длительном нарушении всасывания жиров, применении антибиотиков, нарушающих нормальный состав микрофлоры кишечника, возможны нарушения свертывания крови. В этих случаях необходимо парентеральное введение витамина К. У новорожденных кишечник стерил, а грудное молоко обеспечивает только 1/5 необходимого количества витамина К, поэтому для профилактики геморрагии всем новорожденным показано однократное внутримышечное введение витамина К.

Витамин Е. Источники витамина Е (α-токоферол — наиболее активный из группы сходных соединений) — растительное масло, печень, яйца. Суточная потребность в витамине

составляет 8—10 мг. Витамин Е является основным антиоксидантом — ингибитором свободнорадикального (перекисного) окисления в организме человека. Наиболее легко свободнорадикальному окислению подвергаются полиненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов мембран и SH-группы белков, поэтому витамин Е стабилизирует структуру мембран, в том числе и митохондрий, что нормализует энергетический обмен. Дефицит витамина Е проявляется в первую очередь поражением репродуктивных органов. У молодых организмов это приводит к замедлению полового созревания, а у взрослых — к бесплодию. Недостаток витамина Е вызывает дегенеративные изменения эпителия семявыносящих канальцев, нарушает развитие беременности, вызывает гибель плода. При дефиците витамина Е могут наблюдаться дистрофия мышц и гемолитическая анемия в результате активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах эритроцитов и мембранах лизосом мышечных клеток. Выходящие в цитозоль ферменты разрушают мышечную ткань, увеличивая креатинурию. Симптомы дефицита витамина Е развиваются при одновременном потреблении полиненасыщенных жиров.

6.2. ЖЕЛЧНОКАМЕННАЯ БОЛЕЗНЬ

Желчь — это вязкая жидкость желто-зеленого цвета, содержащая мицеллы из компонентов, продуцируемых печеночными клетками; она накапливается в желчном пузыре.

Важнейшие компоненты желчи:

- желчные кислоты — 6,2 %;
- желчные пигменты (продукты распада гема) — 3,2 %;
- холестерин — 0,5 %;
- фосфолипиды — 0,5%.

Основная функция желчи — участие в переваривании и всасывании липидов. Эту функцию выполняют желчные кислоты, эмульгирующие жиры и таким образом обеспечивающие гидролиз жиров панкреатической липазой. Секретция желчи является также основным путем выведения избытка холестерина из организма. Он выводится как в виде желчных кислот, которые синтезируются в печени из холестерина, так и в свободном виде. Холестерин — гидрофобное вещество, поэтому в растворенном состоянии в виде мицелл желчи его удерживают желчные кислоты. Соотношение желчных кислот и холестерина должно быть приблизительно 12:1. При уменьшении образования желчи или увеличении количества в желчи холестерина последний выпадает в осадок. Этот густой масляни-

стый осадок пропитывается солями кальция, желчными пигментами и со временем превращается в камни.

Факторы, способствующие образованию желчных камней:

- инфекции. Ферменты микроорганизмов превращают конъюгированные желчные кислоты, обладающие большей поверхностной активностью, в неконъюгированные, активность которых ниже; следовательно, они хуже эмульгируют холестерин;
- снижение концентрации желчных кислот в желчном пузыре в результате снижения скорости их синтеза;
- нарушение энтерогепатической циркуляции желчных кислот, например, в результате заболеваний кишечника.

Обычно желчные камни состоят из смеси холестерина, желчных пигментов и кальция с примесями других веществ; они имеют темно-коричневую окраску. Чисто холестериновые камни встречаются реже и имеют форму тутовых ягод.

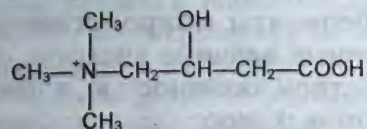
Перемещение камней из желчного пузыря через желчный проток в кишечник проявляется «печеночной коликой» — сильной болью в правом подреберье в результате спастического сокращения гладких мышц. Если камень нарушает отток желчи из желчного пузыря, то развивается механическая (обтурационная) желтуха.

6.3. НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА ЖИРНЫХ КИСЛОТ

β -Окисление жирных кислот является важнейшим источником энергии в работающих мышцах в аэробных условиях. Оно происходит в матриксе митохондрий, куда доставляются активные формы жирных кислот (ацил-СоА), с помощью специального карнитинового челнока. Фермент, переносящий ацил с СоА на карнитин — карнитин-ацил-СоА-трансфераза, является регуляторным в процессе β -окисления, от скорости его работы зависит скорость всего процесса окисления жирных кислот. β -Окисление может быть нарушено в результате действия ряда факторов, приводящих к снижению скорости переноса жирных кислот через мембрану митохондрий, например:

- при генетическом дефекте карнитинацилтрансферазы в скелетных мышцах;
- при лечении сахарного диабета сульфаниламочевойной, так как она ингибирует карнитинацилтрансферазу;
- при низкой активности ферментов, синтезирующих карнитин из незаменимых аминокислот: лизина и метионина; снижение концентрации карнитина замедляет процесс β -окисления;

- при длительном гемодиализе, когда теряется карнитин;
- при длительной ацидурии, так как карнитин выводится как основание с органическими кислотами.



Карнитин

Скорость β -окисления может снизиться также вследствие нарушения активности ферментов при процессе окисления жирных кислот внутри митохондрий. Наиболее часто встречается генетический дефект фермента *ацил-CoA-дегидрогеназы*. В митохондриях человека 3 типа такого фермента: для дегидрирования жирных кислот с короткой, средней и длинной цепями. Дефект фермента дегидрогеназы, окисляющего жирные кислоты со средней цепью, встречается наиболее часто — 1:10 000. Генетические дефекты этого фермента распространены больше, чем дефект фермента фенилаланингидроксидазы, вызывающий фенилкетонурию. Для детей грудного возраста в отличие от взрослых β -окисление жирных кислот, получаемых с грудным молоком, является основным источником энергии. У детей с дефектом данного фермента уменьшается скорость β -окисления жирных кислот, глюкоза используется в большей степени, чем при нормальном метаболизме, и в результате развивается гипогликемия. Это состояние является причиной внезапной детской смертности более чем в 10 % случаев.

Снижение скорости β -окисления жирных кислот в результате указанных причин у взрослых приводит к мышечной слабости, невозможности длительной физической работы. В мышечных клетках накапливаются вакуоли жира. В результате нарушения структуры мембран мышечных клеток происходит выделение миоглобина в кровь и наблюдается миоглобинурия.

6.4. ОЖИРЕНИЕ ПЕЧЕНИ

Печень активно синтезирует жиры из продуктов распада углеводов. В норме имеется баланс между скоростью синтеза жиров в печени и скоростью выведения их из печени в кровь в составе ЛОНП. При нарушении этого баланса в печени накапливаются жиры и происходит ожирение печени. Причин, которые вызывают ожирение печени, много. Это прежде всего нарушение синтеза ЛОНП. Для образования нормальной

структуры ЛОНП необходимы белки — аполипопротеины (апо) В-100 и А-II и значительное количество фосфатидилхолина. Синтез белков, входящих в состав ЛОНП, и формирование самого липопротеинового комплекса требуют нормального состояния мембран эндоплазматического ретикула. Поражение клеток печени в результате гепатитов различной этиологии, интоксикаций, сахарного диабета, хронической алкогольной интоксикации, отсутствия незаменимых аминокислот в пище, например метионина — донора метильных групп, необходимых для синтеза фосфотидилхолина, приводит к нарушению синтеза ЛОНП и в итоге к ожирению печени. Ожирение печени может развиваться при длительном голодании в результате интенсивной мобилизации жира из жировой ткани и перемещения освободившихся жирных кислот в печень. Диагноз ожирения печени может быть поставлен по результатам биопсии, если в гепатоцитах обнаруживаются вакуоли с жиром.

6.5. ОЖИРЕНИЕ

Ожирение — увеличение отложения жира в жировых клетках (адипоцитах). Ожирение наблюдается почти у 50 % населения старше 50 лет.

Жировая ткань — главный энергетический банк, так как запасы углеводов в организме человека не превышают 150 г, что может обеспечить энергией работу организма приблизительно на сутки, а человек с массой тела 70 кг имеет около 14 кг жировой ткани.

Контроль за отложением энергетических субстратов — жиров (триацилглицеринов — ТАГ) в адипоцитах и их мобилизацией происходит с участием гормонов (рис 6.3).

После еды при увеличении концентрации глюкозы в крови синтез жиров под влиянием инсулина в адипоцитах увеличивается.

Под влиянием инсулина в адипоцитах активируются следующие процессы:

- транспорт глюкозы в клетки;
- реакции гликолиза и пентозофосфатного пути, необходимые для синтеза жирных кислот и α -глицерофосфата;
- поступление жирных кислот в клетки под действием ЛП-липазы и их синтез из продуктов распада глюкозы;
- синтез жиров.

Липолиз в этот период ингибируется в результате дефосфорилирования гормончувствительной липазы под действи-

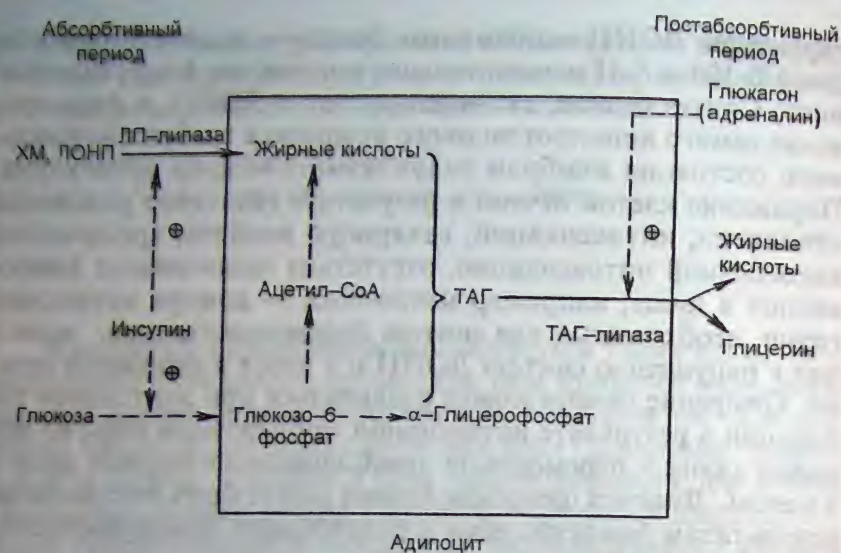


Рис. 6.3. Метаболизм в клетках жировой ткани в абсорбтивный и постабсорбтивный периоды (схема).

ем инсулина. Таким образом, усилению синтеза жира больше всего способствует прием пищи, богатой жирами и углеводами.

Масса жировой ткани определяется как количеством адипоцитов, так и их размерами. В результате анализа развития детей и ряда экспериментов показано, что количество жировых клеток существенно может увеличиваться в период младенчества и в период роста в юности при перекармливании. В результате перекармливания закрепляется на более высоком уровне чувство голода, что приводит к избыточному потреблению пищи. Если ожирение развивается в более поздний период, то, как правило, увеличивается содержание жира в адипоцитах, но не количество адипоцитов. При снижении массы тела уменьшается размер жировых клеток без существенного изменения их количества.

Первичное ожирение развивается при избытке поступающей в организм с пищей энергии по сравнению с ее расходом. Ведущий фактор ожирения — алиментарный дисбаланс — избыточная энергетическая ценность питания (60 % случаев первичного ожирения). Количество потребляемой пищи зависит от многих факторов, в том числе и от регуляции чувства голода и насыщения. Эти чувства определяются концентрацией в крови глюкозы, гормонов пищеварительного тракта, которые инициируют чувство насыщения. Такие гормоны, как холецистокинин, нейротензин, бомбазин, являются пептидами и выделяются в кровь при поступлении пищи в пищеварительный

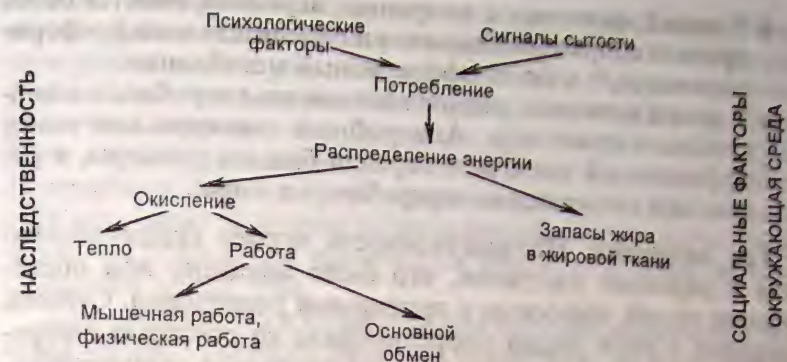


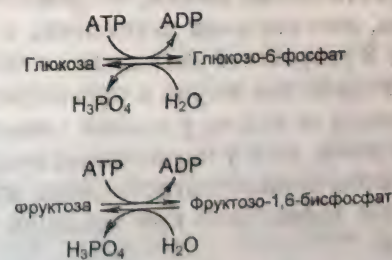
Рис. 6.4. Факторы, влияющие на депонирование и мобилизацию жира.

тракт. На соотношение процессов депонирования и мобилизации жира влияет много факторов (рис. 6.4).

Безусловно, имеются выраженные индивидуальные различия в увеличении массы тела при избыточном потреблении пищи. До настоящего времени метаболические различия между тучными и худыми людьми однозначно определить невозможно. Более эффективный (с меньшими потерями энергии) тип обмена веществ может предрасполагать к ожирению, менее эффективный способствует поддержанию массы тела даже при низкой физической активности.

Предложено несколько теорий, объясняющих различия метаболизма у тучных и худых людей.

Генетически детерминированная разница в функционировании бесполезных циклов: эти циклы состоят из пары метаболитов, превращаемых друг в друга с помощью двух ферментов. Одна из этих реакций идет с затратой АТФ:



Если эти субстраты превращаются друг в друга с одинаковой скоростью, то происходит «бесполезный» расход АТФ и соответственно источников энергии, например жиров.

- У людей, склонных к ожирению, вероятно, имеется более прочное сопряжение дыхания и окислительного фосфорилирования, т.е. более эффективный метаболизм.
- У людей возможно разное соотношение аэробного и анаэробного гликолиза. Анаэробный гликолиз как менее эффективный «сжигает» гораздо больше глюкозы, в результате снижается ее переработка в жиры.

Ген ожирения. Наследственность играет существенную роль в развитии ожирения, что было показано при обследовании людей, выросших с приемными родителями. Степень ожирения у этих людей коррелировала со степенью ожирения их настоящих родителей, а не приемных, следовательно, хотя влияние социальных условий существенно, но влияние наследственного фактора более выражено. Впервые ожирение как результат мутаций было описано в 1950 г. у линии мышей (ob/ob). Ген ожирения — *obese gene* — обнаружен у человека и других млекопитающих. Одиночные мутации в этом гене приводят к избыточной массе тела.

Описано пять одиночных мутаций, которые ассоциируются с фенотипом ожирения. Для этого фенотипа характерно повышенное отложение жиров в жировой ткани, чрезмерное потребление пищи, низкая физическая активность, сниженный энергетический баланс и развитие сахарного диабета II типа.

Продуктом экспрессии гена ob является белок ob. Тривиальное название этого белка «лептин» (от греч. leptos — тонкий). Он состоит из 145 аминокислотных остатков и секретируется в кровь адипоцитами. Получены доказательства того, что белок ob действует как гормон, контролирующий массу жировой ткани. В эксперименте при внутривенном введении животному (крысе) белка ob в количестве 6—8 мкг в день увеличиваются энергетический обмен, потребление кислорода, температура тела, двигательная активность и снижается потребление пищи. В результате уменьшается масса тела вследствие снижения количества жиров в организме. Это действие белка ob проявляется не только у мышей линии ob/ob с дефектным геном ожирения, но и у нормальных мышей с ожирением, вызванным избыточным потреблением жиров. Действие белка ob наиболее эффективно при введении в латеральный желудочек мозга.

Следовательно, одним из органов-мишеней белка ob является центральная нервная система (ЦНС), через которую гормон осуществляет свое действие.

Патогенез ожирения при дефекте гена ob может быть следующим: низкий уровень лептина в крови является сигналом

недостаточного количества запаса жиров в организме. Этот сигнал включает механизмы, повышающие аппетит и в результате приводящие к увеличению массы тела. Однако ожирение у человека — полигенное заболевание, оно может вызываться различными причинами. Даже если жировые клетки продуцируют в кровь достаточное количество белка ob, может развиваться ожирение, так как в результате индивидуальных особенностей организма создается более высокий порог концентрации белка ob, прежде чем включаются механизмы, приводящие к снижению массы тела.

Изменение порога концентрации белка ob возможно в процессе индивидуального развития организма, поэтому некоторые индивидуумы с нормальной массой тела в ранний период жизни превращаются в тучных в зрелом возрасте. На синтез белка ob влияют гормоны.

В настоящее время активно изучаются свойства белка и его полиморфные формы для решения вопроса о возможности применения этого белка с целью регуляции массы тела человека.

Нарушения метаболизма у людей, страдающих ожирением. У людей с избыточным количеством жировой ткани имеются следующие общие отклонения от нормального обмена веществ:

- ▲ снижена толерантность к глюкозе (может восстанавливаться при снижении массы тела);
- ▲ гипертриглицеридемия в результате гиперлипопротеинемий II—V типов, чаще всего повышена концентрация ЛОНП и ЛНП;
- ▲ гиперинсулинемия;
- ▲ снижена продукция гормона роста.

Наиболее распространенные последствия ожирения — сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет, желчнокаменная болезнь.

Вторичное ожирение — это тип ожирения, которое развивается в результате какого-то основного заболевания, чаще всего эндокринного.

Гипофизарное ожирение (болезнь Иценко — Кушинга) развивается в результате гиперфункции коры надпочечников.

Гипотиреозное ожирение — следствие недостаточности функции щитовидной железы.

Гипоовариальное ожирение — результат снижения секреции половых гормонов, часто развивается после удаления яичников.

6.6. ДИСЛИПОПРОТЕИНЕМИИ

Дислипопротеинемии — это нарушения состава липопротеинов крови и транспорта липидов кровью. Проявляются чаще в повышении концентрации какого-либо типа липопротеинов. При этом соответственно увеличивается концентрация липидов — основных компонентов данного типа липопротеинов. Например, при гиперхиломикронемии наблюдаются гипертриглицеридемия, повышение концентрации ТАГ, при повышении концентрации ЛНП — гиперхолестеринемия. Основные причины дислипопротеинемии — это нарушение структуры и функций белков и ферментов, участвующих в обмене данного типа липопротеина. *Основные липопротеины крови человека (табл. 6.1):*

- хиломикроны, синтезируемые в кишечнике и транспортирующие экзогенные жиры в периферические ткани;
- ЛОНП, синтезируемые в печени и транспортирующие эндогенные жиры;
- ЛНП, образующиеся в крови в результате удаления жиров из ЛОНП под действием ЛП-липазы и являющиеся транспортной формой холестерина в ткани;
- ЛВП, образующиеся как предшественники в печени, обогащающиеся холестерином в крови, возвращающие избыток холестерина в печень и поставляющие некоторые апопротеины в другие ЛП: например, апо С-II и апо Е в хиломикроны.

Таблица 6.1

Состав липопротеинов крови

Класс липопротеинов	Плотность	Состав				
		ТАГ	холестерин	эфир холестерина	фосфолипиды	белки
Хиломикроны	0,92—0,96	86 %	1	5	7	апо С-II апо В-48 апо Е
ЛОНП	0,95—1,006	50 %	7	13	20	апо В-100 (50 %) апо С-II (45 %) апо Е следы
ЛНП	1,006—1,063	8	10	35	30	апо В-100 (90 %) апо С-II (10 %)
ЛВП	1,063—1,125	8	4	12	24	апо А-I апо А-II (80 %) апо С-II (15 %)



Рис. 6.5. Функции липопротеинов в транспорте липидов.

Функции основных аполипипропротеинов:

- апо В-100 — основной апопротеин ЛОНП, синтезируется в печени;
- апо В-48 — основной апопротеин хиломикронов;
- апо С-II — активатор ЛП-липазы;
- апо Е — белок, взаимодействующий с рецепторами клеток;
- апо А — активатор ЛХАТ (лецитинхолестеролацилтрансфераза).

На рис. 6.5 показан общий обзор функций липопротеинов. Экзогенный путь пищевых жиров проходит через стадию образования хиломикронов (3), эндогенных — через образование ЛОНП (5). Хиломикроны содержат апопротеин В-48 и в крови получают апо С-II и апо Е от ЛВП.

Все липопротеины эндогенного пути вместо апо В-48 содержат белок В-100, синтезируемый в печени. Липопротеинлипаза действует на обоих путях (реакции 4 и 6), образуя остаточные хиломикроны (ХМ_{ост}), липопротеины промежуточной плотности и ЛНП, которые захватываются рецепторами гепатоцитов (реакции 7 и 10) и других тканей. Предшественники ЛВП образуются в печени (реакция 11). ЛВП₁, обогащаясь холестерином в крови, обратимо превращаются в ЛВП₂ (реакции 8 и 9) под действием ферментов ЛХАТ (лецитин-холестеролацил-трансфераза) и печеночной триглицеридлипазы. Белок, переносящий холестерин, переносит эфиры холестерина с ЛВП на

ЛОНП, ЛПП и ЛНП, которые доставляют его в печень. Таким образом, ЛВП играют главную роль в переносе холестерина из периферических тканей в печень, где он становится доступным для синтеза желчных кислот и последующего выведения из организма.

Нарушения обмена липопротеинов широко распространены и являются причинами или проявлением 30 различных болезней. Все дислиппротеинемии делятся на 5 классов. Имеется подробная характеристика первичных (генетически обуслов-

Таблица 6.2

Первичные гиперлиппротеинемии

Тип	Другие названия болезни	Генетическая форма	[Холестерин] в плазме	[ТАГ] в плазме	Риск развития атеросклероза	Клинические проявления
I	Экзогенная гипертриглицеридемия Семейная гипертриглицеридемия (гиперхиломикронемия) Индукцированная жирами гиперлиппротеинемия	Ауто-сомная рецессивная (редкая)	От нормы до ↑	↑↑↑	Нет	Панкреатит, ксантоматоз, гепатоспленомегалия
II	Семейная гиперхолестеринемия	Ауто-сомная доминантная	↑↑↑	А) N Б) ↑	Очень высокий, особенно коронарных артерий	Ранний атеросклероз, ксантоматоз
III	Семейная дисбеталипопротеинемия Флотирующая беталипопротеинемия	Доминантная; тип наследования не определен (довольно распространенная)	↑↑↑	↑↑↑	Очень высокий (коронарных и периферических артерий)	Ранний атеросклероз, ксантоматоз

Продолжение

Тип	Другие названия болезни	Генетическая форма	[Холестерин] в плазме	[ТАГ] в плазме	Риск развития атеросклероза	Клинические проявления
IV	Эндогенная гипертриглицеридемия Семейная гиперпребеталипопротеинемия Индукцированная углеводами триглицеридемия	Генетически гетерогенная (распространенная)	От нормы до ↑	↑↑↑	Увеличение риска	Возможен ранний атеросклероз, снижение толерантности к глюкозе, гиперурикемия
V	Семейная гипертриглицеридемия комбинированная экзогенная и эндогенная гипертриглицеридемия	Генетически гетерогенная (довольно распространенная)	От нормы до ↑	↑↑↑↑	Не выражен	Панкреатит, ксантоматоз, сенсорная нейропатия, гиперурикемия, снижение толерантности к глюкозе

Обозначения: N — норма; ↑↑↑↑ — сильно увеличено; ↑↑↑ — увеличение средней степени; ↑ — небольшое увеличение; → не изменяется.

ленных) дислиппротеинемий и вторичных, являющихся результатом других заболеваний. Изменения состава крови для каждого класса дислиппротеинемий, как первичных, так и вторичных, имеют общие характерные признаки (табл. 6.2 и 6.3).

Гиперхиломикронемия. Физиологическая гиперхиломикронемия наблюдается в течение 10—12 ч после принятия жирной пищи. Если в голодном состоянии концентрация ТАГ хиломикронов повышена, то имеет место гиперхиломикронемия. Исчезновение хиломикронов из кровотока зависит от многих факторов:

- наличия нормальной ЛП-липазы (фермент локализован в эндотелии капилляров);
- присутствия в крови ЛВП, поставляющих апо С-II и апо Е;
- нормально функционирующего механизма переноса этих аполиппротеинов на хиломикроны, что необходимо для активации ЛП-липазы и гидролиза ТАГ в составе липопротеинов;
- наличия достаточного количества аполиппротеинов.

Таблица 6.3

Вторичные гиперлипидопроteinемии

Изменение состава	[Холестерин]	[ТАГ]	Причина	Механизм гиперлипемии
Тип I	Норма или ↑*	↑↑↑	Системная эритематозная волчанка	Связывание Ig с гликозалипогликанами эндотелия капилляров, ↓ активности ЛП-липазы
Тип IIa ↑↑↑ ЛНП	↑↑↑	N	Заболевания печени, гипотиреозидизм	↓ катаболизма ЛНП
Тип IIb ↑↑↑ ЛНП ↑ ЛОНП	↑↑↑	↑↑	Нефротический синдром Синдром Кушинга	↑ секреции ЛОНП → ↑ образования ЛНП
Тип III ↑↑↑ реминантных ЛП (β-мигрирующих)	↑↑↑	↑↑	Моноклональная гаммапатия	Образование комплексов Ig с ЛОНП или с реминантными частицами, что нарушает их метаболизм Секреция ЛОНП ↑
Тип IV ↑↑ ЛОНП	От нормы до ↑	↑↑	Моноклональная гаммапатия Сахарный диабет Алкоголь Оральные контрацептивы	

* Обозначения те же, что в табл. 6.2.

Нарушение любого из этих факторов приводит к развитию гиперхиломикронемии. Действительно, имеются наследственные формы гиперхиломикронемии, обусловленные дефектом ЛП-липазы, белков апо С-II и апо Е.

Гиперхиломикронемия проявляется повышением концентрации ТАГ (более 200 мг/дл) натощак. Если плазму крови таких больных держать при температуре 4 °С в течение суток, то на поверхность всплывают жирные хлопья кремового цвета, образованные хиломикронами. При выраженной гиперхиломикронемии развиваются ксантомы, представляющие собой отложения ТАГ, происходит ранняя потеря памяти, характерны боли в животе. Если концентрация ТАГ пре-

вышает 4000 мг/дл, то развивается липемия сетчатки (lipaemia retinalis), при которой липиды откладываются на сетчатке и в дальнейшем ухудшается зрение. Независимо от этиологии облегчение состояния наступает при резком ограничении пищевых жиров и такая диета продлевает жизнь больного.

Гиперхолестеринемия. Наиболее распространенным типом гиперлипидемии является гиперхолестеринемия, приводящая к развитию атеросклероза.

6.7. БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АТЕРОСКЛЕРОЗА (ЭТИОЛОГИЯ, ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА, ПРОФИЛАКТИКА, ЛЕЧЕНИЕ)

Атеросклероз — патологическое изменение внутренней (интимы) и частично средней (меди) оболочек артерий. Слово образовано от греч. «атере» — каша, основной компонент которой — эфиры холестерина (ЭХС), включенные в уплотненную склерозированную бляшку.

Клиническими проявлениями атеросклероза являются различные широко распространенные сосудистые заболевания разных органов: сердца, аорты, головного мозга, почек, нижних конечностей. Атеросклеротическая бляшка затрудняет кровоток и вызывает ишемию и гипоксию органа, а при полной закупорке сосуда бляшкой или индуцированным ею тромбом возникают инфаркт миокарда, инсульт, гангрена конечностей.

Патологические процессы в сосудистой стенке развиваются у человека по мере старения: возникает гетерогенность эндотелия и других клеток внутренней оболочки, в результате накопления «пенистых» клеток под эндотелием на внутренней поверхности сосудов появляются липидные пятна и полосы, а затем на их месте — атеросклеротические бляшки. В состав бляшек входят, кроме ЭХС, ТАГ, гликозаминогликаны, коллаген, эластин, кальций, макрофаги, мГМК, погибшие клетки. В атеросклеротических бляшках с большой частотой обнаруживается ДНК герпесвирусов (цитомегаловируса и простого герпеса), а также хламидии. Роль этих микроорганизмов остается пока невыясненной. При разрыве фиброзной капсулы под действием механических и токсических факторов облепается холестериновая каша и такая «злокачественная» бляшка становится центром агрегации тромбоцитов, отложения сгустков фибрина и тромбообразования.

Атеросклероз — полифакториальное заболевание сосудов. Поэтому по мере накопления экспериментальных данных возникли разные гипотезы об его этиологии и патогенезе: холестериновая или инфильтрационная, тромбогенная, клональная

Таблица 6.4

Факторы, повышающие риск заболеваний, связанных с атеросклерозом

РОССИЯ, 1996 г.

Модифицируемые факторы		Немодифицируемые факторы
образ жизни	биохимические и физиологические факторы	личностные параметры
<p>Высококалорийное питание с повышенным содержанием животного жира и ХС</p> <p>Курение</p> <p>Избыточное потребление алкоголя</p> <p>Сниженная физическая активность</p>	<p>Гиперхолестеринемия за счет ЛНП</p> <p>Артериальная гипертензия</p> <p>Низкий уровень в крови ЛВП</p> <p>Гипертриацилглицеринемия</p> <p>Ожирение</p> <p>Сахарный диабет</p> <p>Тромбогенные факторы</p>	<p>Возраст</p> <p>Пол</p> <p>Наличие у близких родственников клинических проявлений атеросклероза (для мужчин — до 55 лет, для женщин — до 65 лет)</p> <p>Наличие в анамнезе семьи больного гиперлипидемий</p>

США, 1993 г.

1. Возраст для мужчин — старше 45 лет.
2. Возраст для женщин — старше 55 лет или ранняя менопауза без эстрогенотерапии.
3. Наличие в семейной истории ишемической болезни сердца.
4. Курение.
5. Артериальная гипертензия.
6. Сахарный диабет.

(«миома сосуда»), аутоиммунная и перекисная. Все гипотезы связаны с транспортом ЛП и холестерина (ХС) в сосудистую стенку. Повышенный уровень ХС является бесспорным патогенетическим фактором развития атеросклероза, а его этиологическая роль четко проявляется у молодых пациентов с наследственным характером патологии: мутационным изменением первичной структуры апо В-100 (белка ЛНП) или ЛНП-рецептора. В обоих случаях нарушается комплементарность между ЛНП и ЛНП-рецептором гепатоцитов и других органов, а также рецепторный эндоцитоз ЛНП клетками и повышается содержание в крови ЛНП и ХС.

Для пожилых и в меньшей мере для молодых существенную роль играют и другие факторы риска: химическая и физико-

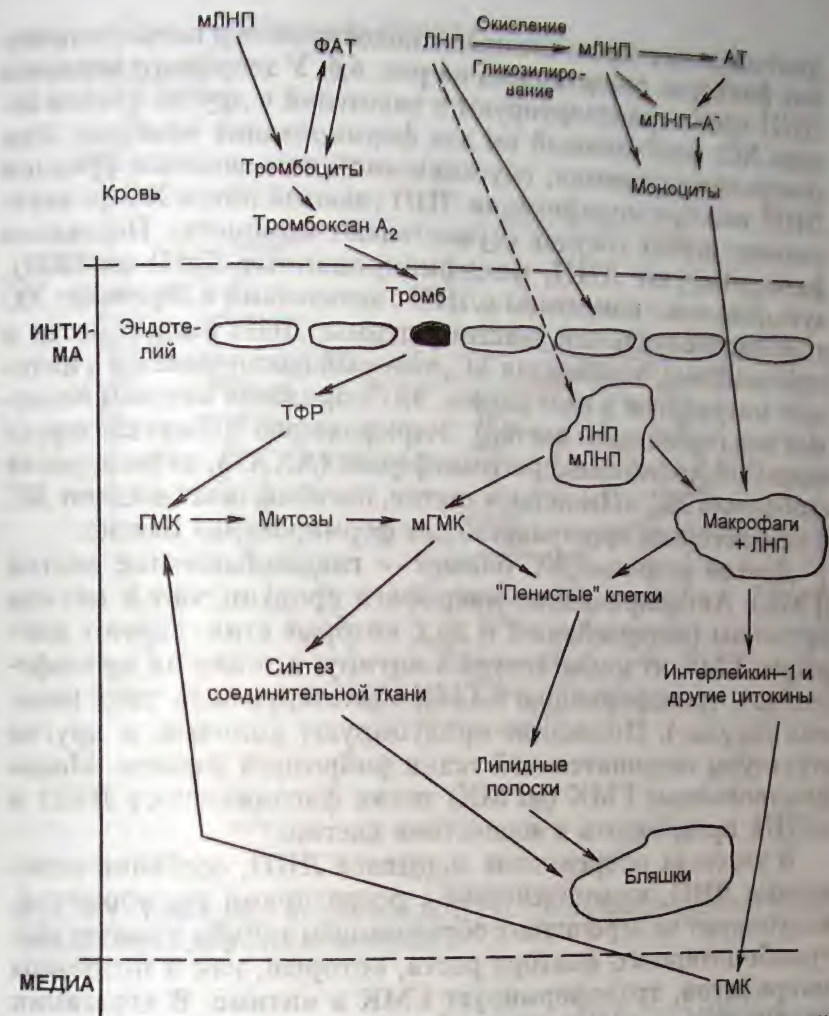


Рис. 6.6. Интегральная модель развития атеросклероза артериальной стенки.

АТ — антитела к мЛНП; ФАТ — фактор активации тромбоцитов; ТФР — тромбоцитарный фактор роста.

химическая модификация ЛНП (гликозилирование, особенно при сахарном диабете, перекисное окисление ХС и полиненасыщенных жирных кислот в ЛНП, десалирование эндотелия (инпротеолиз, агрегация), факторы повреждения факторы, например никотин, высокие концентрации ЛНП и ЛОНП), повышенная свертываемость крови, гемодинамические факторы (бляшки возникают в местах изгибов, ветвлений (табл. 6.4). изменение содержания гормонов (табл. 6.4).

Интегральная модель атеросклероза артериальной стенки,

учитывающая перечисленные этиологические и патогенетические факторы, представлена на рис. 6.6. У здорового человека ЛНП крови транспортируют в эндотелий и другие клетки сосуда ХС, необходимый им для формирования мембран. При гиперхолестеринемии, обусловленной повышенным уровнем ЛНП, или при модификации ЛНП главный поток ХС во внутреннюю стенку сосудов осуществляют моноциты. Последние фагоцитируют ЛНП, модифицированные ЛНП (мЛНП), аутоиммунные комплексы мЛНП с антителами и переносят ХС в субэндотелиальный участок интимы. ЛНП разрушаются в эндолизосоме, освобождая ХС, который накапливается в цитозоле макрофагов в виде капель ЭХС, придавая клеткам пенистый вид («пенистые» клетки). Этерификацию ХС катализирует ацил-СоА-холестеринацилтрансфераза (АХАТ), активируемая свободным ХС. «Пенистые» клетки, погибая, освобождают ХС в межклеточное пространство для формирования бляшек.

Другой источник ХС бляшек — гладкомышечные клетки (ГМК). Активированные макрофаги продуцируют в интиме цитокины (интерлейкин-1 и др.), которые стимулируют миграцию ГМК из меди сосуда в интиму, а также их пролиферацию и трансформацию в ГМК синтезирующего типа («миома сосуда»). Последние продуцируют коллаген и другие структуры соединительной ткани фиброзной бляшки. Модифицированные ГМК (мГМК) также фагоцитируют ЛНП и мЛНП, превращаясь в «пенистые» клетки.

В участках повреждения эндотелия ЛНП, особенно окисленные ЛНП, взаимодействуя с рецепторами тромбоцитов, индуцируют их агрегацию с образованием тромба и синтез ими тромбоцитарного фактора роста, который, как и цитокины макрофагов, трансформирует ГМК в интиму. В агрегации тромбоцитов участвует также фактор активации тромбоцитов, синтезируемый в тромбоцитах, эндотелии, макрофагах, и тромбоксан A_2 , образующийся в тромбоцитах из арахидоновой кислоты. Кроме того, поврежденный эндотелий продуцирует меньше оксида азота (NO). В результате уменьшается паракринное действие NO на тромбоциты и ГМК артерий, что приводит к активации инозитолфосфатной системы регуляции, увеличению содержания кальция в этих клетках и соответственно к агрегации тромбоцитов и сужению сосудов, т.е. к атерогенному эффекту.

Около 70 % ХС крови находится в составе ЛНП. Следовательно, гиперхолестеринемия — главный фактор риска развития атеросклероза, как правило, связана с увеличением в крови содержания ЛНП и их предшественников ЛОНП — двух атерогенных ЛП. Поэтому более строгим фактором риска следует считать не гиперхолестеринемия, а дислипотеинемия.

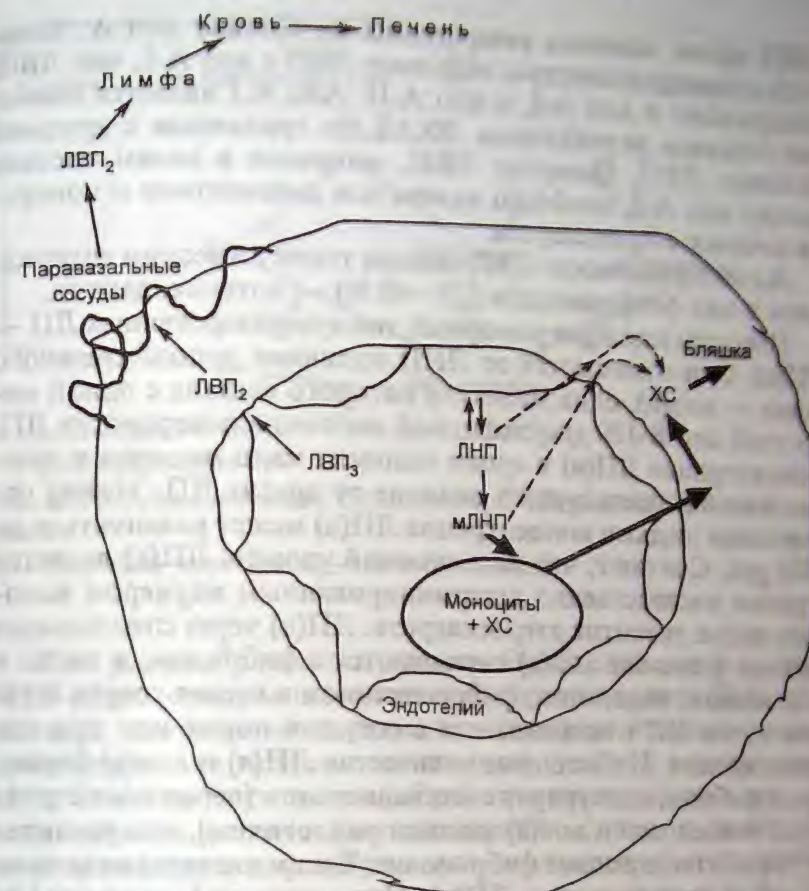


Рис. 6.7. Транспорт атерогенных (ЛНП) и антиатерогенных (ЛВП) липопротеинов в стенке артерий.

мию — количественное преобладание ЛНП, ЛОНП и качественные изменения в структуре ЛНП (мЛНП).

Атерогенность избыточных количеств ЛНП и особенно мЛНП обусловлена их способностью взаимодействовать с рецепторами моноцитов, ГМК, тромбоцитов и вызывать образование «пенистых» клеток и атеросклеротических бляшек (см. рис. 6.6). Антагонисты ЛНП — ЛВП, обладая специальным механизмом извлечения ХС из клеток и других ЛП при участии лецитин-холестеринацилтрансферазы (ЛХАТ), осуществляют обратный транспорт «лишнего» ХС из органов и крови в печень, где он в основном превращается в желчные кислоты. Антиатерогенные ЛВП, имеющие примерно в 10 раз меньшую молекулярную массу, чем ЛНП, легко проходят между клетками эндотелия и через стенку сосудов, удаляя из клеток интимы избыточный ХС. Далее через паравазальные сосуды ЛВП транспортируют ХС в печень (рис. 6.7).

ЛВП крови человека гетерогенны по составу апо А. Большой антиатерогенностью обладают ЛВП с апо А-I, чем ЛВП, содержащие и апо А-I, и апо А-II. Апо А-I является наиболее сильным активатором ЛХАТ по сравнению с другими белками ЛВП. Поэтому ЛВП, имеющие в своем составе только апо А-I, особенно важны для диагностики и контроля лечения атеросклероза.

Антиатерогенность ЛВП связана также с высоким содержанием в них фосфолипидов (25—40 %) — антиоксидантов.

Известен еще один минорный тип суператерогенных ЛП — ЛП(а). Они отличаются от ЛНП наличием дополнительного белка — апо(а), одна молекула которого связана с одной молекулой апо В-100 дисульфидной связью на поверхности ЛП. Концентрация ЛП(а) в крови человека мало меняется в течение жизни индивидуума в отличие от других ЛП. Между отдельными людьми концентрация ЛП(а) может различаться до 1000 раз. Считают, что повышенный уровень ЛП(а) является строгим наследственно детерминированным маркером высокого риска развития атеросклероза. ЛП(а) через специальные домены в составе апо(а) связываются с фибрином, а также с коллагеном, эластином, фибронектином в стенке сосуда и таким путем ХС откладывается в сосудах в норме или при его повреждении. Избыточные количества ЛП(а) и апо(а) блокируют фибрин, конкурируя с плазминогеном [первичные структуры последнего и апо(а) высокомолекулярны], что усиливает тромбоз и тормозит фибринолиз. Таким является механизм высокой атерогенности ЛП(а). Известны изоформы апо(а), обусловленные разными аллелями одного гена в 6-й хромосоме. Для больных ишемической болезнью сердца более характерны высокий уровень ЛП(а) в крови и преобладание низкомолекулярных изоформ апо(а). Существуют этнические различия по концентрации ЛП(а) и спектру изоформ апо(а).

Взаимодействие ЛП с клетками происходит при участии различных типов *рецепторов*. В клетки паренхиматозных органов и соединительной ткани ЛНП транспортируются в норме путем рецепторного многостадийного регулируемого эндоцитоза с помощью ЛНП-рецептора (апо В, Е-рецептора). Этот рецептор является трансмембранным доменным гликопротеином, содержащим галактозу и сиаловую кислоту. N-концевой домен связывает лиганд — ЛНП. На поверхности гепатоцитов находится около 50—70 % всех ЛНП-рецепторов организма. При высоком содержании в печени ХС репрессирует синтез ЛНП-рецепторов по принципу отрицательной обратной связи. Напротив, эстрогены, иодтиронины и гипохолестеринемические препараты — статины активируют их синтез (рис. 6.8).

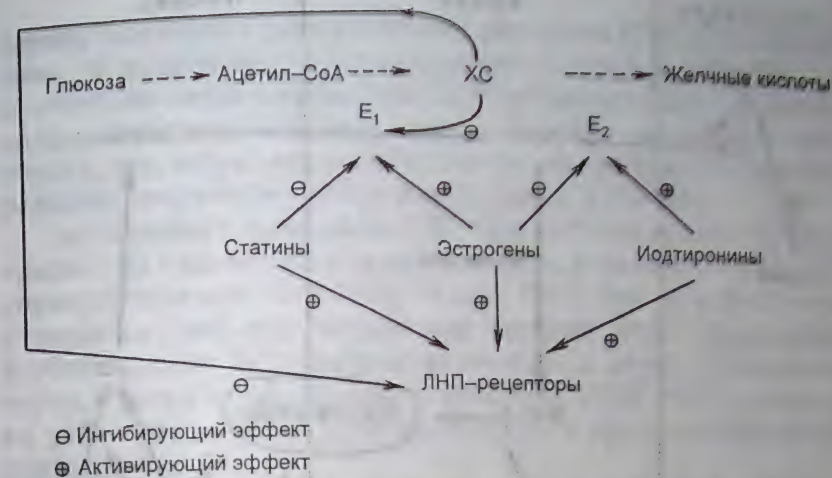


Рис. 6.8. Регуляция синтеза холестерина, ЛНП-рецепторов и желчных кислот.

E_1 — ГМГ-СоА-редуктаза; E_2 — 7α -гидроксилаза.

При разнообразных мутациях (чаще делециях) в гене ЛНП-рецептора, расположенном в коротком плече 19-й хромосомы, возникает *наследственная семейная гиперхолестеринемия* гомо- или гетерозиготного типа (частота в популяции 10^{-6} и $2 \cdot 10^{-3}$ соответственно). Особенно ранние и тяжелые, не поддающиеся диетотерапии формы коронарного атеросклероза характерны для гомозиготной патологии. Мутации нарушают комплементарность между апо В-100 ЛНП и ЛНП-рецептором или связаны с нарушением синтеза и других этапов функционирования рецептора в процессе эндоцитоза. В итоге у больного наблюдаются резкая гиперхолестеринемия (до 1000 мг/дл у гомозигот и до 500 мг/дл у гетерозигот), повышение уровня ЛНП, увеличение времени их циркуляции в крови, что способствует образованию атерогенных мЛНП.

Другая наследственная форма атеросклероза, клинически сходная с предыдущей, но более мягкая, — *семейная гиперхолестеринемия, обусловленная структурным дефектом апо В-100 ЛНП*. Она возникает при доминантных мутациях в нескольких кодонах гена апо В-100 (2-я хромосома), соответствующих С-концевой половине белка. Такой апо-белок не связывается с ЛНП-рецептором, что увеличивает содержание ЛНП и ХС в крови. К атерогенному эффекту могут приводить также мутации в гене конститутивной эндотелиальной изоформы NO-синтазы (eNOS) с уменьшением продукции NO. Известны и другие формы наследственного дислипидопроteinемий, связанных с атеросклерозом.

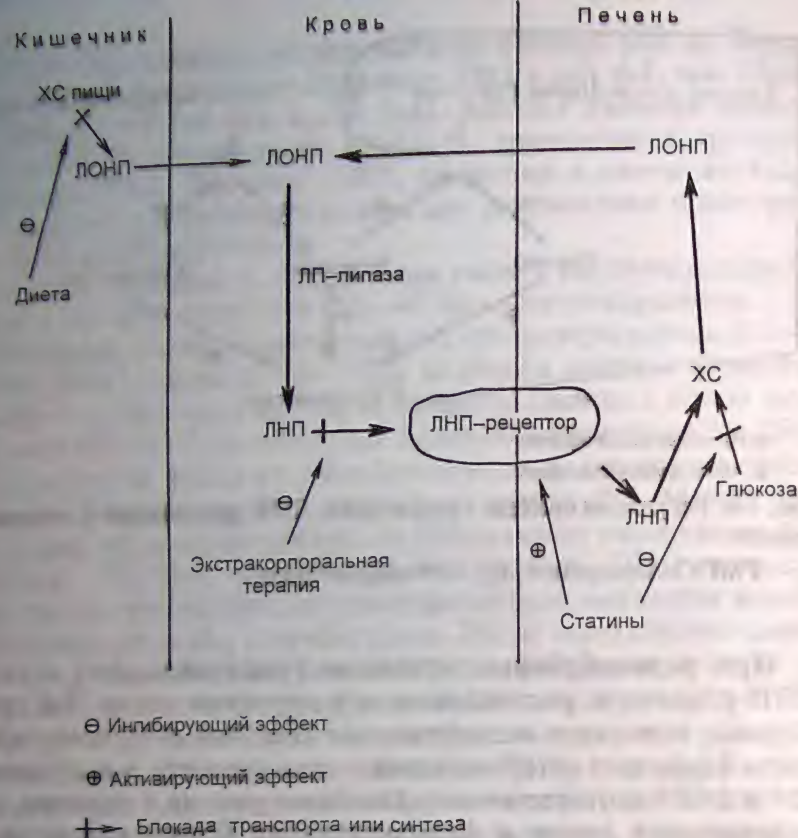


Рис. 6.9. «Порочный круг» в циркуляции холестерина и липопротеинов.

При гликозилировании ЛНП-рецептора у больного сахарным диабетом происходит и гликозилирование апо В-100 ЛНП. Нарушается их комплементарное взаимодействие и развиваются *вторичная дислипотеинемия* и атеросклероз.

В моноцитах (макрофагах) и в эндотелии сосудов основную роль в поглощении ЛНП играют не ЛНП-рецепторы, а особые нерегулируемые скэвинджер-рецепторы, которые особенно активно участвуют в захвате мЛНП с последующим их транспортом в стенку сосуда (см. рис. 6.7).

Уровень ХС в крови зависит от огромного количества наследственных и ненаследственных факторов, связанных с его поступлением в организм с пищей, синтезом и регуляцией, с транспортом, расходом на синтез желчных кислот и других соединений и с выведением. Около 80 % ХС синтезируется в печени. При увеличении количества ХС в пище (более 300—500 мг/сут) у здорового человека уменьшается его синтез в печени, так как ХС и оксидериваты ХС ингибируют ак-

тивность и синтез регуляторного фермента ГМГ-СоА-редуктазы. И наоборот, у вегетарианцев синтез эндогенного ХС происходит очень интенсивно. При патологических процессах нарушается динамическое равновесие между указанными факторами, что может привести к гиперхолестеринемии и возникновению «порочного круга» в циркуляции ХС и ЛП.

Экзогенный и эндогенный ХС (рис. 6.9) поступает соответственно из кишечника и печени в кровь в составе ЛОНП, которые превращаются в ЛНП. Часть ЛНП при их избытке поглощается клетками печени при участии ЛНП-рецепторов. В обогащенных ХС гепатоцитах угнетается синтез ЛНП-рецепторов, поэтому уменьшается транспорт ЛНП и ХС в печень, но увеличиваются их уровень в крови и продолжительность циркуляции.

Торможение потока ХС из крови в печень усиливает синтез эндогенного ХС и выброс в кровь новых порций ЛОНП, превращающихся опять в ЛНП. Такой «порочный круг» возникает при мутационной модификации или гликозилировании белков ЛНП либо ЛНП-рецептора. При высокой концентрации ЛНП в крови и их модификации усиливается транспорт ЛНП и ХС в стенку сосуда при участии в основном моноцитов-макрофагов и их скэвинджер-рецепторов. Подобный «порочный круг» нельзя прервать ограничением в пище ХС или глюкозы (см. рис. 6.9). В случае гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии снижение уровня ХС в крови может быть достигнуто использованием статинов, ингибирующих ГМГ-СоА-редуктазу и индуцирующих экспрессию единственного нормального аллеля гена ЛНП-рецептора в гепатоцитах. При гомозиготной семейной гиперхолестеринемии эффективны только экстракорпоральная терапия (удаление из крови ЛНП), частичная трансплантация печени и генная терапия.

Такие гормоны, как *иодтиронины* и *эстрогены*, уменьшают в крови содержание ХС и ЛНП (см. рис. 6.8). Иодтиронины индуцируют на уровне транскрипции образование ЛНП-рецепторов и 7 α -гидроксилазы печени — регуляторного фермента синтеза желчных кислот из ХС. Эстрогены ингибируют образование последнего фермента, но активируют синтез ЛНП-рецепторов и ГМГ-СоА-редуктазы печени (регуляторный фермент синтеза ХС). Поэтому при гипотиреозе (гипофункция щитовидной железы) развивается гиперхолестеринемия и вторично — атеросклероз. У женщин до климактерического периода уровень общего ХС в крови несколько ниже, содержание ЛВП более высокое, что тормозит развитие атеросклероза. Однако содержание ХС в гепатоцитах и желчи женщин выше. Поэтому у них чаще образуются в желчных путях холестери-

Таблица 6.5

Содержание в крови общего холестерина ($ХС_{общий}$), $ХС_{лип}$ и выраженность гиперхолестеринемии

Гиперхолестеринемия	Уровень холестерина	$ХС_{общий}$				$ХС_{лип}$, мг/дл	
		мг/дл		ммоль/л		мг/дл	
		а	б	а	б	а	б
Тяжелая	Очень высокий	Более 300	Более 320	Более 7,8	Более 8,3	—	Более 220
Умеренная	Высокий	250—300	240—320	6,5—7,8	6,2—8,3	Более 155	160—220
Мягкая	Пограничный	200—250	200—240	5,2—6,5	5,2—6,2	135—155	130—160
Отсутствует	Желательный	Менее 200	Менее 200	Менее 5,2	Менее 5,2	Менее 135	Менее 130

Примечание. а — контрольные величины (Россия, Европейское атеросклеротическое общество); б — контрольные величины для США.

новые камни (желчнокаменная болезнь). После менопаузы при отсутствии заместительной терапии эстрогенами указанные различия между мужчинами и женщинами нивелируются.

Лабораторная диагностика атеросклероза основана на анализе в крови липидов, ЛП (табл. 6.5; 6.6) и оценке других факторов риска (см. табл. 6.4). При наличии у близких родственников клинических проявлений наследственного атеросклероза в молодом и среднем возрасте целесообразна ранняя оценка факторов риска у детей с целью коррекции образа жизни и возможного раннего лечения. При этом следует ориентироваться на следующие маркеры риска развития атеросклероза: высокий уровень в крови $ХС$, ЛНП, мЛНП, ЛП(а), апо В, а также рассчитать производные величины — коэффициенты атерогенности:

$$Ка_1 = \frac{ХС_{ЛНП} + ХС_{ЛОНП}}{ХС_{ЛВП}} = \frac{ХС_{общий} - ХС_{ЛВП}}{ХС_{ЛВП}} \leq 3-4;$$

$$Ка_2 = \frac{апо В}{апо А-1} \leq 1.$$

Маркеры резистентности к атеросклерозу — низкое содержание в крови ЛП(а), апо В-100 (белок ЛНП и ЛОНП) и высокое — апо А-1 и апо А-4 (белки ЛВП).

Разрабатываются методы неинвазивной лабораторной ди-

Таблица 6.6

Диапазон содержания в крови здоровых людей триацилглицеринов, липопротенинов, холестерина липопротенинов и аполипопротенинов

	Концентрация	
	мг/дл	ммоль/л
Триацилглицерины	50—200	0,55—2,30
Холестерин	150—250	3,9—6,5
Общий	135—155	3,5—4,0
ЛНП:		
мужчины	35—70	0,9—1,8
женщины	40—80	1,0—2,1
Липопротенины, г/л		
ЛНП	3,0—4,5	
ЛВП:		
мужчины	1,2—4,2	
женщины	2,5—6,5	
ЛП(а)	Афроамериканцы 0,4—0,75	
	Кавказцы 0,02—0,57	
	(предельно допустимые величины — 0,2—0,3)	
Апо В	0,6—1,8	
Апо А-1	1,1—2,2	

агностики, в которых для анализа $ХС$ используются неповрежденная кожа пациентов, их слюна и слезы.

Для прогноза здоровья, диагностики, профилактики и лечения применяются алгоритмы обследования пациентов с учетом факторов риска и выработки рекомендаций по коррекции образа жизни, лечению и периодичности повторного лабораторного контроля.

Профилактика атеросклероза основана на здоровом образе жизни, корректирующем ненаследственные и наследственные факторы риска развития патологии (см. табл. 6.4).

Лечение атеросклероза начинают с диетотерапии, учитывающей уровень $ХС$, ЛП, ТАГ крови и их соотношение. Рекомендуется ограничивать содержание $ХС$ в суточном рационе (до 100 мг при наследственных формах и до 300 мг при вторичных дислипидопроteinемиях) и ТАГ животного происхождения с преобладанием насыщенных жирных кислот. Коррекцию диеты проводят введением пищевых добавок: жидкие жиры (масла) с повышенным содержанием полиненасыщенных жирных кислот из растений (ω -6-жирные кислоты) и из морских рыб и морских животных (ω -3-жирные кислоты), антиоксидан-

ты (витамины Е, С, β -каротин), фосфолипиды сои и нерафинированного растительного масла, творог и другие продукты, содержащие субстраты для синтеза фосфолипидов в организме человека, белки растительного происхождения, пищевые волокна (овощи, фрукты, пектин, овсяные отруби). Все пищевые добавки нормализуют обмен и удаление ХС из организма.

Полиненасыщенные жирные кислоты уменьшают синтез ЛОНП в печени и, следовательно, уровень ТАГ, ЛНП и ХС в крови.

Образующиеся из них эйкозаноиды изменяют агрегацию тромбоцитов и сосудистый тонус. Особенно перспективными для профилактики и лечения считаются ω -3-жирные кислоты в составе жиров морских рыб и животных. Из них в эндотелии человека синтезируется простациклин I_2 , тормозящий агрегацию тромбоцитов, свертывание крови, обладающий вазодилатационными и гипотоническими свойствами. Созданы лечебные препараты ω -3-жирных кислот (полиен, эйконол, максепа). Рекомендуются соблюдать определенное соотношение между ω -6- и ω -3-жирными кислотами из-за некоторого антагонизма между соответствующими эйкозаноидами.

При выраженной гиперхолестеринемии (см. табл. 6.5) проводится лекарственная терапия, основанная на следующих принципах: ингибирование синтеза ХС (статины — аналоги оксидериватов ХС), интенсивное выведение из организма желчных кислот и вторично ХС (анионообменные смолы), торможение перекисного окисления (пробукол, витамин Е). При одновременной гипертриацилглицеринемии необходимо не только еще больше ограничить прием пищевых жиров, но и тормозить их эндогенный синтез из глюкозы (фибраты, активирующие липопротеинлипазу и угнетающие образование ЛОНП в печени; пероральные низкомолекулярные гепарины, активирующие липопротеинлипазу). Никотиновая кислота и ее производные не только снижают секрецию ЛОНП из печени в кровоток, но и замедляют распад и повышают уровень ЛВП, а также являются пока единственным средством, снижающим высокий уровень ЛП(а) в крови (более 0,2—0,3 г/л).

В последние годы показано, что при настойчивом лечении атеросклероза, особенно с использованием статинов, происходят стабилизация структуры фиброзных бляшек, укрепление их верхнего слоя, предотвращается переход в «злокачественные» бляшки и даже наблюдается обратное их развитие.

При неэффективности диет- и фармакотерапии, например при наследственных формах атеросклероза, показаны экстракорпоральная терапия с целью удаления из крови ЛНП (плазмаферез, криоплазмасорбция), хирургические операции частичного илеошунтирования (для усиления выведения желчных

кислот) и частичной пересадки здоровой печени (или аналогичная генно-инженерная процедура). Эффективность этих жестких методов лечения зависит от выраженности генетических изменений у больных, т.е. гетеро- или гомозиготности по мутантным доминантным аллелям генов ЛНП-рецепторов и апо В-100.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ

1. Одно из наиболее распространенных наследственных заболеваний связано с дефектом фермента ацил-СоА-дегидрогеназы, дегидрирующей жирные кислоты со средней длиной углеводной цепи (6—10). Такие больные страдают от приступов гипогликемии, сочетающейся с гипокетонемией, которые происходят обычно после 6—7-часового перерыва между приемами пищи.

Объясните происхождение симптомов гипогликемии и гипокетонемии у данных больных.

2. Два взрослых здоровых человека (А и Б) за один прием пищи получили:

	Белки	Жиры	Углеводы
А.	50 г	—	300
Б.	50 г	50	300

Какой из пунктов наиболее правильно характеризует изменения в составе липопротеинов крови испытуемых через 2,5 ч после еды:

А. У испытуемого А наиболее значительно увеличено количество:

1. ЛНП.
2. ЛВП.
3. ЛОНП и ХМ.
4. ЛОНП.
5. ХМ.

Б. У испытуемого Б. наиболее значительно увеличено количество:

1. ХМ.
2. ХМ и ЛОНП.
3. ЛНП и ЛВП.
4. ЛОНП.
5. ЛВП.

3. Какой из аполипопротеинов характерен только для хиломикронов?

- А. Апо В-100.
- Б. Апо В-48.
- В. Апо Е.
- Г. Апо А-1.
- Д. Апо А-IV.

4. У пациентов, имеющих генетический дефект апо В-100, значительно повышен уровень ЛНП в крови. Главная причина этого:

- А. Нарушение взаимодействия ЛНП с ЛНП-рецепторами.
- Б. Нарушение способности ЛНП активировать ЛП-липазу.
- В. Снижение способности ЛНП активировать перенос холестерина в ЛВП.

- Г. Увеличение синтеза ЛНП.
 Д. Невозможность эндоцитоза после взаимодействия ЛНП с ЛНП-рецептором.
5. Объясните, почему у пациентов со сниженной секрецией бикарбоната поджелудочной железой даже при нормальной секреции липазы и колипазы развивается стеаторея (непереваренные жиры в кале). Выберите наиболее правильный ответ.
 А. Бикарбонат эмульгирует жиры.
 Б. Бикарбонат активирует панкреатическую липазу.
 В. Бикарбонат снижает ионизацию желчных кислот.
 Г. Бикарбонат создает необходимое значение pH для панкреатической липазы.
 Д. Бикарбонат создает необходимое значение pH для панкреатической липазы и увеличивает ионизацию желчных кислот.
6. Пациент имеет генетический дефект синтеза карнитина и не получает достаточного количества его с пищей. При голодании по сравнению со здоровым человеком в тех же условиях для него характерно (выберите наиболее правильный ответ):
 А. Содержание жирных кислот в крови больше.
 Б. Содержание кетоновых тел меньше.
 В. Содержание глюкозы меньше.
 Г. Скорость окисления глюкозы в тканях выше.
 Д. Правильно все.
7. У мужчины 29 лет обнаружены ксантомы; содержание общего холестерина в крови 290 мг/дл, холестерина ЛНП — 180 мг/дл, холестерина ЛВП — 30 мг/дл, коэффициент атерогенности 8,7. Для установления точного диагноза были выделены и исследованы фибробласты. Количество ЛНП-рецепторов в них оказалось значительно ниже нормы.
 А. Выберите наиболее вероятную причину такого состояния пациента.
 1. Высококалорийное питание с большим количеством холестерина.
 2. Недостаточность ЛП-липазы эндотелия.
 3. Недостаточность лецитин-холестерин-ацилтрансферазы, входящей в состав ЛВП.
 4. Семейная гиперхолестеринемия, связанная с угнетением поступления холестерина ЛНП в паренхиматозные органы.
 5. Дефект 7-гидроксилазы печени, катализирующей превращение холестерина в желчные кислоты.
 Б. Какой препарат наиболее эффективно снижает уровень холестерина?
 1. Ловастин (мевакор, мевинолин).
 2. Холестирамин.
 3. Хенодиол (хенодесоксихолевая кислота).
 4. Линетол.
 5. Клофибрат.
 8. Ловастин (мевакор, мевинолин) является высокоэффективным гипохолестеринемическим (антиатеросклеротическим) препаратом. Каков механизм прямого или косвенного действия ловастина? Выберите один наиболее правильный ответ.

- А. Увеличивает синтез в гепатоцитах ЛНП-рецепторов, участвующих в транспорте холестерина из крови в органы.
 Б. Связывает пищевой холестерин в тонкой кишке и предотвращает его всасывание.
 В. Ускоряет транспорт холестерина из крови в печень при участии ЛВП.
 Г. После биотрансформации в клетках превращается в конкурентный ингибитор регуляторного фермента синтеза холестерина (ГМГ-СоА-редуктазы).
 Д. Тормозит синтез эйкозаноидов — вазоконстрикторов и активаторов агрегации тромбоцитов.
9. Почему у женщин по сравнению с мужчинами частота заболевания атеросклерозом ниже, а желчнокаменной болезнью выше?
 А. Эстрогены активируют на уровне транскрипции регуляторный фермент синтеза холестерина в печени — ГМГ-СоА-редуктазу.
 Б. Эстрогены активируют на уровне транскрипции синтез ЛНП-рецепторов гепатоцитов, что приводит к уменьшению содержания ЛНП и общего холестерина в крови и увеличению количества холестерина в печени.
 В. Насыщение желчи холестерином у женщин способствует образованию билирубиновых камней.
 Г. Насыщение желчи холестерином у женщин вызывает образование холестериновых камней.
 Д. Эстрогены ингибируют фермент, катализирующий превращение холестерина в желчные кислоты.
10. У мужчин, употребляющих алкоголь в небольших дозах, наблюдается тенденция к замедлению развития атеросклероза. Выберите правильные суждения о прямом или косвенном антиатеросклеротическом действии малых доз этанола.
 А. Этанол угнетает синтез тестостерона в семенниках, что увеличивает относительное содержание эстрогенов, синтезируемых у мужчин в семенниках и надпочечниках.
 Б. Эстрогены усиливают транспорт холестерина из крови в печень и его синтез в печени.
 В. В печени увеличивается образование из холестерина желчных кислот.
 Г. Этанол угнетает регуляторный фермент синтеза холестерина в печени — ГМГ-СоА-редуктазу.
 Д. Этанол увеличивает содержание антиатерогенного α -холестерина (холестерина ЛВП) в крови.
11. Полиненасыщенные ω -3-жирные кислоты, содержащиеся в морской рыбе и морских животных северных и дальневосточных морей, и созданные на их основе лекарственные препараты (полнен, эйконол, максепа) рекомендованы для профилактики атеросклероза. Каков возможный механизм действия указанных жирных кислот и препаратов?
 А. В организме человека эти кислоты превращаются в эйкозаноиды (простагландины, простациклины, тромбоксаны).
 Б. Являются вазоконстрикторами и активаторами агрегации тромбоцитов.

- В. Являются вазодилататорами и ингибиторами агрегации тромбоцитов.
- Г. Обладают способностью ингибировать ГМГ-СоА-редуктазу.
- Д. Активируют лецитин-холестерин-ацилтрансферазу, входящую в состав ЛВП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аронов Д.М., Перова Н.В., Ахмеджанов Н.М. Диагностика и лечение атерогенных дислипидемий. — М.: Инфорполиграф, 1996. — 44 с.
2. Долгов В., Морозова В., Мацишевская Р. и др. Клинико-диагностические значения лабораторных показателей. — М.: Лабинформ. Центр, 1995. — 215 с.
3. Карабасова М.А. Патологические состояния, связанные с нарушением обмена липидов. Атеросклероз. — В кн.: Элементы патологической физиологии и биохимии. — М.: Изд-во МГУ, 1997. — С. 18—53.
4. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз. — СПб.: Изд-во «Питер», 1995. — 298 с.
5. Репин Р.С., Смирнов В.Н. Фундаментальные науки против атеросклероза. — М.: НПО «Союзмединформ», 1989. — 70 с.
6. Cohn R.M., Roth K.S. Biochemistry and Disease: Bridging Basic Science and Clinical Practice. — Baltimore: Williams and Wilkins, 1996.
7. Gaw A., Cowan R.A., O'Reilly D.St.J. et al. Clinical Biochemistry. — Edinburgh: A Churchill Livingstone, 1995. — P. 120—121.
8. Marks D.B., Marks A.D., Smith C.M. Basic Medical Biochemistry. — Baltimore: Williams and Wilkins Co, 1996. — P. 487—571.
9. Naito H.K. 18th Annual Symposium, National Academy of Clinical Biochemistry. Atherogenesis: Current Topics on Etiology and Risk Factors//Clin. Chem. — 1995. — Vol. 41, N 1. — P. 132—176.
10. Pages J.-Ch., Andreoletti M., Loux N. et al. Gene therapy of familial hypercholesterolemia//C.R.Soc. Biol. — 1996. — Vol. 190, N 1. — P. 53—65.

Глава 7 | БИОХИМИЯ ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА¹

Сахарный диабет является следствием нарушения инсулиновой регуляции функций ряда клеток организма. Нарушение регуляции может быть обусловлено снижением образования инсулина (диабет I типа, инсулинзависимый сахарный диабет — ИЗСД) или повреждением механизмов трансдукции инсулинового сигнала, причем концентрация инсулина в крови может оставаться нормальной или быть повышенной (диабет II типа, инсулиннезависимый сахарный диабет — ИНСД). Характерными признаками сахарного диабета I и II типов являются гипергликоземия и после приема пищи, и натощак, а также глюкозурия. Тяжелыми клиническими проявлениями считаются острые осложнения диабета — коматозные состояния, связанные с ацидозом и нарушением водно-солевого обмена. Поздние осложнения диабета: микроангиопатии (нефропатия, ретинопатия и др.) и макроангиопатии — часто приводят к ранней инвалидизации. Сахарный диабет — распространенная болезнь, занимает третье место среди причин смертности после сердечно-сосудистых заболеваний и рака. В мире около 100 млн человек больны сахарным диабетом; каждые 10—15 лет число больных диабетом во всех странах мира удваивается. Наибольшему риску заболеть сахарным диабетом подвержены население развивающихся стран и группы малообеспеченных лиц в индустриально развитых странах.

Диабетом II типа заболевают в зрелом возрасте, обычно после 40 лет. Он развивается постепенно, симптомы выражены умеренно, острые осложнения редки. Диабет I типа начинается обычно в юношеском возрасте, иногда в детстве, редко у взрослых. Протекает гораздо тяжелее, чем диабет II типа. При недостаточном врачебном контроле нередко развиваются острые осложнения. Распространенность диабета I типа почти в 10 раз меньше, чем диабета II типа.

Сахарный диабет вследствие высокой распространенности, ранней инвалидизации и уменьшения продолжительности жизни больных является одной из важнейших медико-социальных проблем.

Изучение механизмов инсулиновой регуляции, этиологии и

¹ Глава написана совместно с канд. мед. наук С.А.Кцовой.

патогенеза сахарного диабета, поиски новых методов лечения проводятся в мире очень широко и интенсивно. В последнее время главные задачи исследований — переход от диагностики диабета к его предсказанию, от лечения к предупреждению.

7.1. ИНСУЛИН И ГЛЮКАГОН КАК РЕГУЛЯТОРЫ ДЕПОНИРОВАНИЯ И МОБИЛИЗАЦИИ ГЛИКОГЕНА И ЖИРОВ

Инсулин участвует в регуляции таких клеточных процессов, как метаболизм, трансмембранный перенос ионов, аминокислот, глюкозы, синтез и распад белков. С влиянием на ядерные процессы — репликацию и транскрипцию — связано участие инсулина в регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки, а также трансформации клеток. В патогенезе основных клинических проявлений сахарного диабета в наибольшей мере проявляется нарушение инсулиновой регуляции обмена глюкозы, жиров и аминокислот, связанного с энергетическим обменом.

В результате согласованной работы разных органов и систем в организме поддерживается энергетический гомеостаз, под которым понимают соответствие между потребностью в энергии и обеспеченностью организма энергоносителями. Гомеостаз сохраняется даже при существенных изменениях в приеме пищи и энергетических затратах.

Инсулин, а также тесно взаимодействующий с ним «контринсулярный» гормон глюкагон — главные регуляторы изменений метаболизма при смене состояний пищеварения и голодания (абсорбтивное и постабсорбтивное состояния). На пищеварение приходится 10—15 ч в сутки, а расход энергии происходит в течение всех 24 ч (с определенным снижением в часы ночного сна). Поэтому часть энергоносителей во время пищеварения складывается для использования в постабсорбтивном состоянии (рис. 7.1). Печень, жировая ткань и мышцы — главные органы, связанные с этими изменениями.

Режим запасаания включается после приема пищи и сменяется режимом мобилизации запасов после завершения пищеварения. Следовательно, у человека при обычном трехразовом питании смена режимов происходит трижды за сутки. Однако смена режимов выражена нечетко, поскольку в течение дня промежутки между приемами пищи небольшие (5—6 ч) и постабсорбтивный период едва успевает начаться (если вообще успевает), как наступает время очередного приема пищи. Типичным постабсорбтивным состоянием считают состояние утром до завтрака, после примерно десятичасового ночного

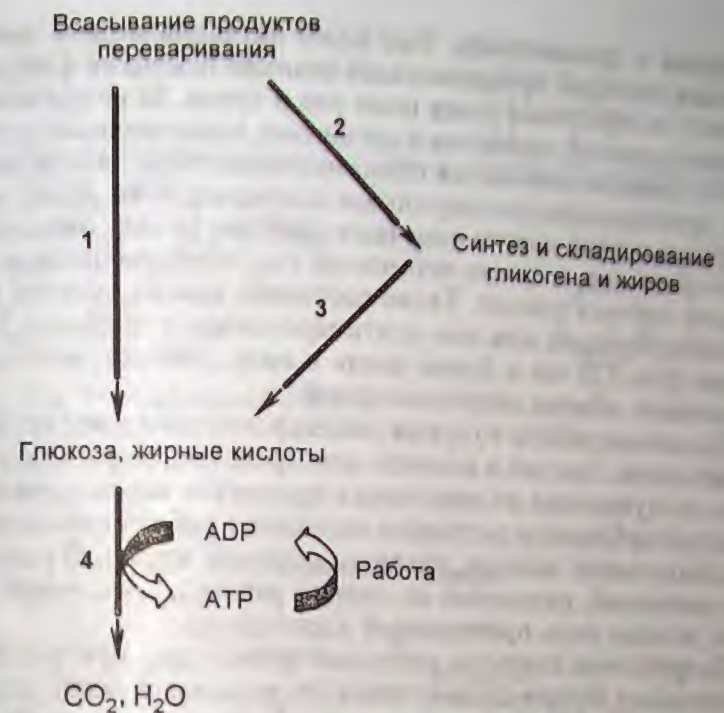


Рис. 7.1. Пути использования основных энергоносителей при пищеварении (1, 2), в постабсорбтивном состоянии (3) и постоянно (4). При голодании глюкоза утилизируется преимущественно нервной тканью, в то время как другие ткани используют в основном жирные кислоты.

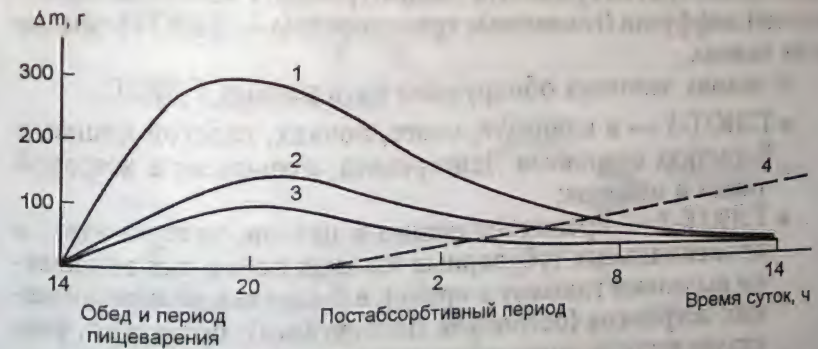


Рис. 7.2. Изменение количества (Δm) энергоносителей в организме человека (в тканях, не в желудке и кишечнике) в течение суток после однократного приема пищи. 1 — гликоген; 2 — жиры; 3 — аминокислоты/белки; 4 — изменение скорости глюконеогенеза, г/сут.

перерыва в приеме пищи. Еще более наглядна модель ритма питания, которой придерживался великий немецкий философ Э.Кант: он принимал пищу один раз в сутки. За сутки исчерпываются запасы гликогена в организме, единственным источником глюкозы становится глюконеогенез, глюкоза используется преимущественно нервными клетками, в то время как почти все другие клетки получают энергию за счет окисления жирных кислот, а также кетонных тел, образующихся в печени из жирных кислот. Такое состояние можно считать как постабсорбтивное или как кратковременное голодание. Эту модель (рис.7.2) мы и будем иметь в виду, рассматривая смену режимов обмена энергосистем.

Мышечная работа во время пищеварения замедляет процессы запасаения, так как в мышцах непосредственно расходуется часть поступающих из кишечника продуктов переваривания. В постабсорбтивном состоянии мышечная работа стимулирует мобилизацию запасов, главным образом жиров. В регуляции изменений, связанных со сменой покоя и мышечной работы, важная роль принадлежит адреналину.

Потребление глюкозы клетками происходит при участии специальных белков-переносчиков (их называют также рецепторами глюкозы), образующих гидрофильные трансмембранные каналы. Существует два основных механизма переноса глюкозы: активный транспорт, зависящий от градиента концентраций ионов Na^+ , и облегченная диффузия. Соответственно есть два основных типа рецепторов глюкозы. Рецепторы, зависящие от концентрации ионов Na^+ , обнаруживаются только в почках и кишечнике, они обеспечивают реабсорбцию глюкозы из почечных канальцев и всасывание ее из просвета кишечника против градиента концентрации. Рецепторы облегченной диффузии (глюкозные транспортеры — ГЛЮТ) есть во всех тканях.

В тканях человека обнаружено пять разных ГЛЮТ:

- ГЛЮТ-1 — в плаценте, мозге, почках, толстой кишке, в β -клетках островков Лангерганса; меньше их в жировой ткани и мышцах;
- ГЛЮТ-2 — преимущественно в печени, энтероцитах, в проксимальных тубулярных клетках почек (все эти клетки выделяют глюкозу в кровь); в β -клетках панкреатических островков (островков Лангерганса). Возможно, участвует в стимуляции глюкозой секреции инсулина;
- ГЛЮТ-3 — во многих тканях, включая мозг, плаценту, почки;
- ГЛЮТ-4 — единственный переносчик, регулируемый инсулином; содержится только в мышцах (скелетных и сердечной) и жировой ткани (инсулинзависимые ткани);

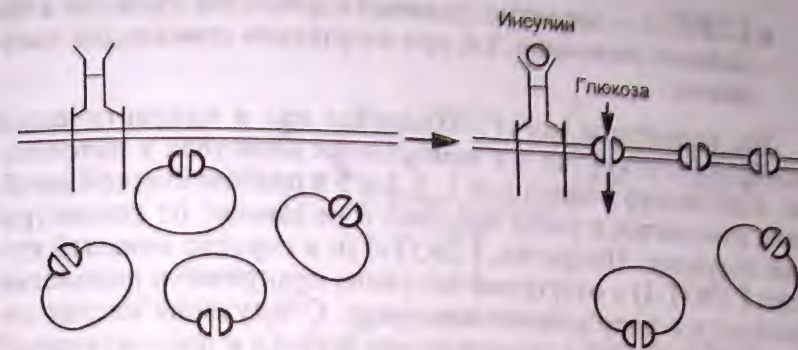


Рис. 7.3. Транслокация ГЛЮТ-4.

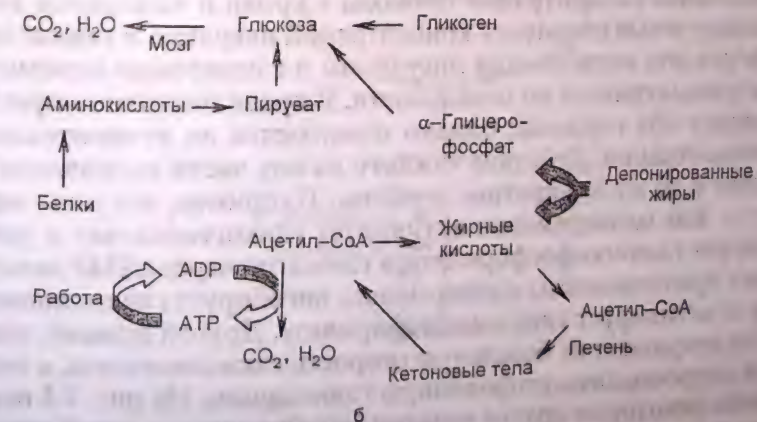
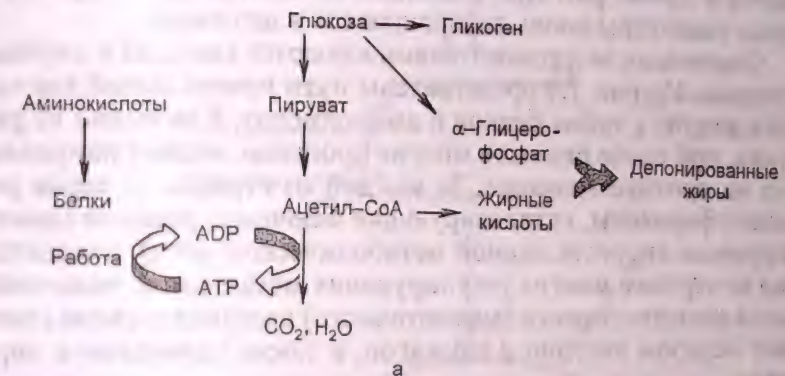


Рис. 7.4. Изменение метаболизма основных энергосистем при смене абсорбтивного (а) и постабсорбтивного (б) состояний.

- ГЛЮТ-5 — вероятно, главный переносчик глюкозы в базальном состоянии, т.е. при отсутствии стимуляции инсулином.

Все рецепторы могут находиться как в плазматической мембране клетки, так и в мембранных везикулах в цитоплазме. Количество рецепторов 1, 2, 3 и 5 в плазматической мембране изменяется в узких пределах и не зависит от концентрации инсулина. Напротив, ГЛЮТ-4 (и в гораздо меньшей степени ГЛЮТ-1) в отсутствие инсулина практически полностью находятся в цитозольных везикулах. Стимуляция клеток инсулином приводит к транслокации везикул к плазматической мембране и их слиянию, в результате чего рецепторы оказываются встроенными в плазматическую мембрану (рис. 7.3). Как показано в экспериментах с жировыми и мышечными клетками, скорость потребления глюкозы при этом увеличивается в 30—40 раз. При снижении концентрации инсулина в среде рецепторы вновь возвращаются в цитозоль.

Основными энергоносителями являются глюкоза и жирные кислоты. На рис. 7.4 представлены пути превращений глюкозы и жиров, а также белков и аминокислот. Как видно из рисунка, при смене режимов многие процессы меняют направление на противоположное. За каждой из стрелок — серия реакций; ферменты, катализирующие ключевые реакции (лимитирующие скорость данной метаболической цепи), находятся под контролем многих регулирующих механизмов, включающих в качестве первого (внеклеточного) вестника сигнала главным образом инсулин и глюкагон, а также адреналин и кортизол.

Первичными сигналами для смены состояний являются изменение концентрации глюкозы в крови и вызванные этим реципрокные изменения концентраций инсулина и глюкагона. Регуляцию метаболизма инсулином и глюкагоном невозможно рассматривать по отдельности. В крови постоянно присутствуют оба гормона, однако изменяются их относительные концентрации. Действие каждого из них часто направлено на одни и те же конкретные мишени. Например, инсулин через путь Ras одновременно активирует гликогенсинтазу и ингибирует гликогенфосфорилазу, а глюкагон через cAMP-зависимые протеинкиназы одновременно ингибирует гликогенсинтазу и активирует гликогенфосфорилазу. Другой пример: инсулин сокращает не базальную скорость глюконеогенеза, а только скорость, стимулированную глюкагоном. На рис. 7.5 показаны некоторые другие мишени метаболических путей глюкозы в печени, общие для инсулина и глюкагона. Кроме того, инсулин снижает секрецию и самого глюкагона.

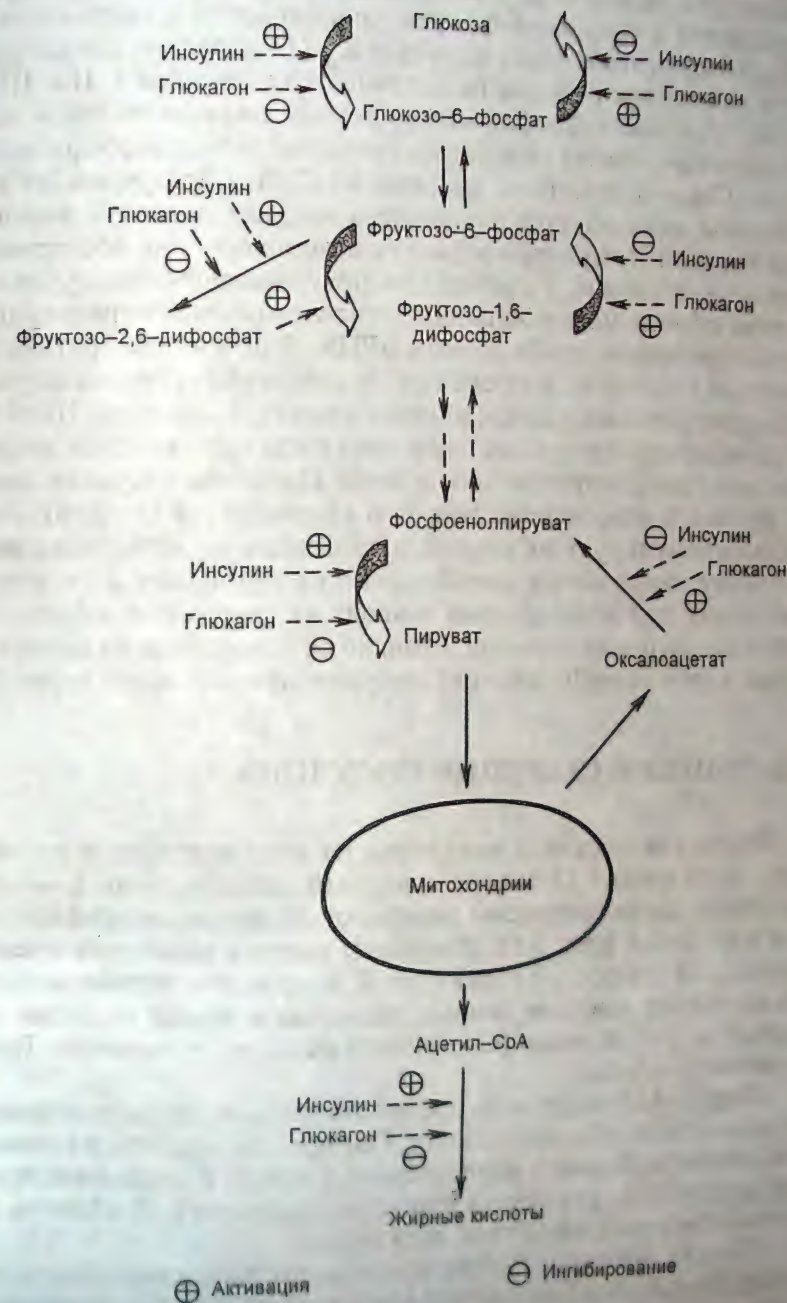


Рис. 7.5. Действие инсулина и глюкагона на метаболизм глюкозы в печени.

Глюкоза проникает в гепатоциты путем облегченной диффузии при участии ГЛЮТ-2, не зависящего от инсулина и имеющего высокую K_m . В гепатоцитах глюкоза быстро превращается в глюкозо-6-фосфат глюкокиназой (гексокиназой IV), которая тоже имеет высокую K_m (12 мМ) и не ингибируется продуктом реакции (в отличие от гексокиназ I, II и III). Далее глюкозо-6-фосфат может использоваться по трем направлениям: синтез гликогена, гликолиз, пентозофосфатный путь. Следует отметить, что ацетил-СоА, образующийся из глюкозы, используется для синтеза жирных кислот и жиров. Все эти пути стимулируются инсулином на пре- или посттрансляционном уровне. Регуляция на претрансляционном уровне в свою очередь может быть двух типов: стимуляция транскрипции и повышение стабильности мРНК. В печени необратимые реакции гликолиза, а также синтез гликогена и синтез жиров стимулируются инсулином и подавляются глюкагоном. Наоборот, необратимые стадии глюконеогенеза подавляются инсулином и стимулируются глюкагоном. Подобная ситуация имеет место и в метаболизме жиров и аминокислот (белков): инсулин стимулирует их синтез, а глюкагон — мобилизацию. Поэтому направление метаболических процессов в сторону запасаения или мобилизации зависит не столько от абсолютной концентрации гормона, сколько от отношения их концентраций ([инсулин]/[глюкагон], инсулин/глюкагоновый индекс).

7.2. СИНТЕЗ И СЕКРЕЦИЯ ИНСУЛИНА

Молекула инсулина построена из двух пептидных цепей: цепь А содержит 21 аминокислотный остаток, цепь В — 30 остатков. Цепи соединены между собой двумя дисульфидными мостиками (рис. 7.6). Инсулины многих животных очень сходны по первичной структуре. С инсулином человека наиболее сходен инсулин свиньи, различие в одной позиции: в цепи В в 30-й позиции (С-концевой остаток), у человека Тре, у свиньи — Ала.

Инсулин образуется из препроинсулина в результате посттрансляционной модификации. Ген препроинсулина в геноме человека представлен единственной копией. В настоящее время интенсивно изучаются строение промоторной области и механизмы регуляции гена инсулина.

Синтез препроинсулина происходит на полирибосомах, связанных с эндоплазматическим ретикулулом. Препроинсулин проникает в люмен ретикулума, где от него отщепляется лидирующая последовательность — N-концевой фрагмент, содержащий 24 аминокислотных остатка. Образовавшийся

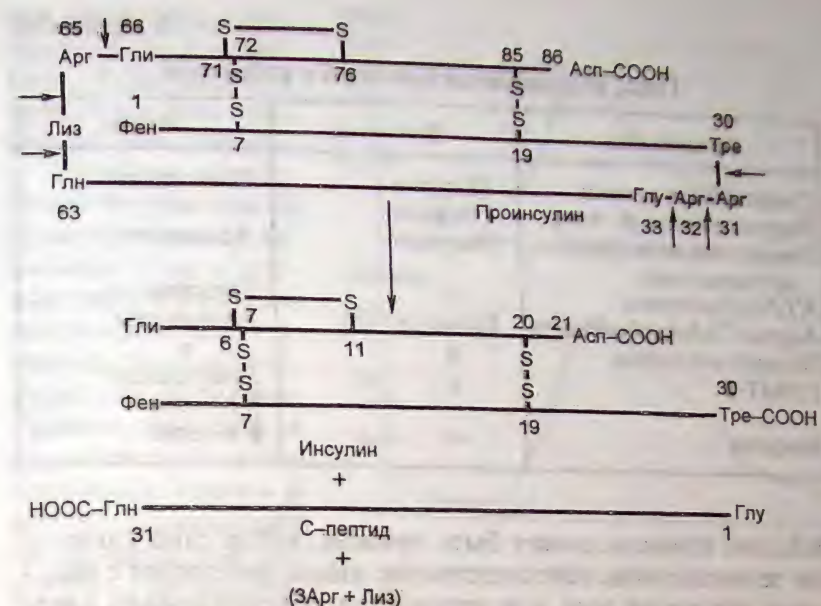


Рис. 7.6. Образование инсулина из проинсулина. Стрелки указывают на гидролизуемые пептидные связи.

проинсулин (86 аминокислотных остатков) перемещается затем в аппарат Гольджи, где упаковывается в секреторные гранулы. В аппарате Гольджи и секреторных гранулах происходит превращение проинсулина в инсулин. В этом превращении участвуют две эндопептидазы: прогормон конвертазы 2 и 3 (ПГ2 и ПГ3; последнюю называют также ПГ1). Эти ферменты расщепляют связи Арг32—Глу33 и Арг65—Гли66. Затем С-концевые остатки Арг и Лиз отщепляются карбоксипептидазой Е (КП-Е; известна также как КП-Н). Этот фермент есть во многих других органах, участвует в процессинге ряда гормонов и нейромедиаторов.

Таким образом, в секреторных гранулах содержатся (и секретируются из них) инсулин и С-пептид в эквимольных количествах. Долгое время С-пептид рассматривали как физиологически неактивное вещество. Недавно было обнаружено, что в физиологических концентрациях он стимулирует потребление глюкозы клетками мышц здорового человека и больных ИЗСД примерно в такой же мере, как инсулин.

Глюкоза регулирует экспрессию гена инсулина, а также генов других белков, участвующих в обмене основных энергоносителей. Транскрипция ряда генов, связанных с метаболизмом, активируется в поджелудочной железе, печени и жировых клетках при потреблении пищи, содержащей углеводы.

Таблица 7.1

Гены, индуцируемые глюкозой и инсулином

Продукт гена	Регулятор	Клетки
Глюкокиназа печени	Инсулин	Гепатоциты
Пируваткиназа (L-тип)	Глюкоза	»
Глицероальдегидфосфат-дегидрогеназа	Инсулин	Адиipoциты
АТФ-цитратлиаза	»	Гепатоциты
Ацетил-СоА-карбоксилаза	Глюкоза	Адиipoциты
Пальмитилсинтаза	»	»
ГЛЮТ-2	»	Гепатоциты
Инсулин	»	β -Клетки
		β -Клетки

Действие глюкозы может быть прямым, когда сама глюкоза или ее метаболиты непосредственно взаимодействуют с аппаратом регуляции гена, или вторичным, обусловленным влиянием глюкозы на секрецию гормонов, главным образом инсулина и глюкагона. Однако выяснить, что является регулятором — инсулин или глюкоза, можно только при использовании клеточных культур, позволяющих строго контролировать содержание этих веществ в среде (табл. 7.1).

При стимуляции глюкозой инсулин быстро освобождается из секреторных гранул, а количество инсулиновой мРНК в клетке возрастает в результате активации транскрипции и стабилизации мРНК. Активация транскрипции требует образования метаболитов глюкозы на стадиях гликолиза. Синтез и секреция инсулина не являются прочно сопряженными процессами. Например, при отсутствии ионов Ca^{2+} в среде глюкоза не стимулирует секрецию инсулина, в то время как синтез активируется. Глюкоза стимулирует синтез инсулиновой мРНК при продолжительной инкубации (2—72 ч). При инкубации в течение 1 ч сколько-нибудь существенного увеличения мРНК не происходит, в то же время включение меченых аминокислот в проинсулин возрастает в 10—20 раз. Актиномицин D (ингибитор транскрипции) при этом не подавляет синтез проинсулина. Из этого следует, что первоначальная стимуляция синтеза (в течение примерно 20 мин после добавления глюкозы) происходит с использованием предсуществующей мРНК и регулируется на уровне трансляции.

Секреция инсулина и С-пептида происходит путем экзоцитоза. Инсулин в растворе легко образует олигомерные агрегаты, преимущественно димеры и гексамеры; ионы Zn^{2+} способствуют такой агрегации. В такой форме инсулин находит-

ся в секреторных гранулах. После секреции содержимого гранул в кровь олигомеры распадаются.

Глюкоза, аминокислоты (особенно аргинин и лизин), кетоновые тела и жирные кислоты в физиологических концентрациях стимулируют секрецию инсулина, причем стимуляция аминокислотами, кетоновыми телами и жирными кислотами проявляется при определенной (субстимулирующей) концентрации глюкозы. Лактат, пируват, глицерин такого влияния не оказывают. Глюкоза является главным регулятором секреции инсулина.

На рис. 7.7 показано изменение концентрации инсулина в крови человека после приема пищи. Одновременно со стимуляцией β -клеток к секреции инсулина происходит ингибирование секреции глюкагона из α -клеток панкреатических островков.

Время полураспада инсулина в крови составляет 3—10 мин, а С-пептида — около 30 мин. Кровь при однократном прохождении через печень теряет до 60 % инсулина. В почках задерживается до 40 % инсулина, содержащегося в протекающей через почки крови, причем в клубочках инсулин фильтруется, а затем наряду с другими белками первичной мочи (альбумин, гемоглобин и др.) реабсорбируется и разрушается в клетках проксимальных канальцев нефрона.

Регуляция секреции инсулина зависит от глюкозосенсорной системы β -клеток, обеспечивающей пропорциональность меж-

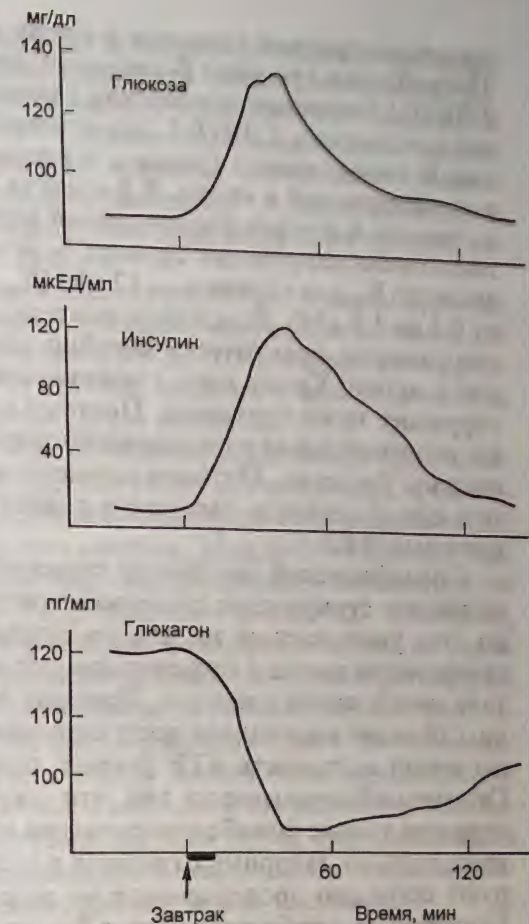


Рис. 7.7. Изменение концентрации в крови глюкозы, инсулина и глюкагона после приема пищи (1 ЕД инсулина содержит 0,4081 мг белка инсулина).

ду концентрацией глюкозы в крови и секрецией инсулина. Потребление глюкозы β -клетками происходит при участии ГЛЮТ-1 (основной переносчик глюкозы в β -клетках человека) и, возможно, ГЛЮТ-2. Эта ступень не является лимитирующей: концентрация глюкозы в клетке быстро уравнивается с концентрацией в крови. В β -клетках глюкоза превращается в глюкозо-6-фосфат глюкокиназой (гексокиназой IV, как и в глюкозосинтезирующих органах — печени, почках), имеющей высокую K_m для глюкозы — 12 мМ (K_m гексокиназ I, II и III — от 0,2 до 1,2 мМ). Вследствие этого скорость фосфорилирования глюкозы практически линейно зависит от ее концентрации в крови. Кроме того, глюкокиназа в β -клетках — лимитирующее звено гликолиза. Поэтому глюкокиназа — вероятно, основной (но не единственный) элемент глюкозосенсорной системы β -клеток. Мутации глюкокиназы приводят к развитию одной из форм сахарного диабета — диабету I типа у взрослых (MODY).

Специфический ингибитор глюкокиназы манногептулоза подавляет стимуляцию глюкозой синтеза и секреции инсулина. Это указывает на то, что молекулы, непосредственно регулирующие синтез и секрецию инсулина, образуются в результате метаболизма глюкозы. Природа этих молекул неизвестна. Согласно имеющимся представлениям, роль такой молекулы может выполнять АТФ (точнее, отношение $[ATP]/[ADP]$). Гипотеза обосновывается тем, что секреция инсулина стимулируется только метаболизируемыми веществами — источниками энергии. Например, глюкоза и глицеральдегид стимулируют секрецию пропорционально скорости их метаболизма. Глицерин не метаболизируется в β -клетках (низкая активность глицеролкиназы) и не стимулирует секрецию инсулина. Однако после обработки рекомбинантным аденовирусом, содержащим бактериальный ген глицеролкиназы, клетки приобретают способность отвечать на глицерин секрецией инсулина в такой же мере, как и на глюкозу.

Есть указание на участие в регуляции секреции инсулина не только гликолиза, но и митохондриальных процессов. В частности, существенное значение могут иметь анаплеротические (восполняющие, компенсирующие) реакции: пируват \rightarrow оксалоацетат, глутамат \rightarrow α -кетоглутарат. Эти реакции увеличивают количество компонентов цитратного цикла, а следовательно, и его мощность. Стимулированная глюкозой секреция инсулина усиливается некоторыми аминокислотами, жирными кислотами, кетонowymi телами; таким образом, в стимуляции секреции участвует не только глюкоза, но все основные энергоносители. Следовательно, количество секретлируемого инсулина пропорционально энергетической ценности

потребляемой пищи. Окисление основных энергоносителей в цикле лимонной кислоты, усиленном анаплеротическими реакциями, может быстро привести к изменению отношений АТФ/АДР и NADH/NAD⁺ в клетке. Изменение концентрации этих веществ в свою очередь приводит к появлению вторых вестников сигнала (возможно, ионов Ca²⁺, сАМР, диацилглицерола, инозитол-3-фосфата), которые включают процесс экзоцитоза инсулиновых гранул.

Механизмы активации экзоцитоза остаются неясными. Ряд экспериментальных данных указывает на участие Ca²⁺/кальмодулинзависимой протеинкиназы (СаМПК), а также полифункциональной СаМПК II, которая найдена в панкреатических островках крысы и активируется глюкозой.

Глюкокиназа — основной элемент глюкозосенсорного механизма β -клеток; она имеется также и в α -клетках, а гликолиз ускоряется пропорционально внеклеточной концентрации глюкозы и в тех, и в других клетках. Между тем секреция гормона (инсулина и глюкагона соответственно) стимулируется глюкозой в β -клетках и подавляется в α -клетках. Возможно, это связано с тем, что в β -клетках в отличие от α -клеток очень высокая активность пируваткарбоксилазы (анаплеротический фермент), сравнимая с активностью в клетках, для которых характерен глюконеогенез (печень, почки). При этом наблюдается пропорциональность между увеличением концентрации цитрата и малата в клетках и секрецией инсулина. Можно думать, что какие-то метаболиты этих путей или связанная с ними активация пируватмалатного челночного механизма участвует в сопряжении стимула с секрецией инсулина.

Популяция β -клеток в панкреатических островках неоднородна. В частности, есть клетки с различной чувствительностью к глюкозе. Это еще один элемент глюкозосенсорного механизма: при высокой концентрации глюкозы увеличивается число клеток, секретлирующих инсулин.

Нарушения секреции инсулина — одна из причин развития инсулиннезависимого сахарного диабета.

7.3. ГЛЮКАГОН И ГЛЮКАГОНОПОДОБНЫЕ ПЕПТИДЫ

Проглюкагон синтезируется α -клетками островков Лангерганса в поджелудочной железе, специализированными нейроэндокринными клетками кишечника (L-клетки), а также некоторыми клетками ЦНС. Процессинг проглюкагона происходит с участием прогормонконвертаз, гидролизующих связи Arg-Arg и Лиз-Arg. При этом образуется ряд пептидов, нео-

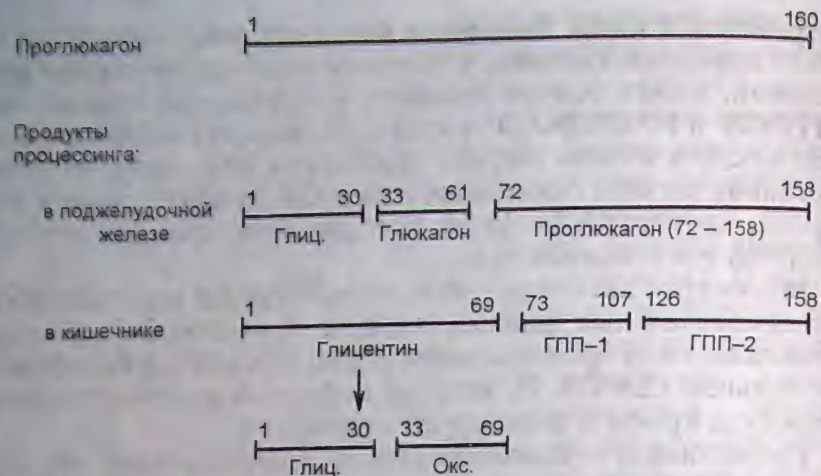


Рис. 7.8. Процессинг проглюкагона в α -клетках поджелудочной железы и в L-клетках кишечника.

Глиц. — глицинтиноподобный пептид; Окс. — оксинтомодулин.

динаковых в поджелудочной железе и в клетках кишечника (рис. 7.8): в α -клетках главный продукт — глюкагон, а в клетках кишечника — структурно сходные глюкагоноподобные пептиды ГПП-1 и ГПП-2. В клетках мозга тоже образуются ГПП. Функции этих пептидов, за исключением ГПП-1, недостаточно изучены. Неизвестен также дальнейший процессинг проглюкагона (72—158) в поджелудочной железе.

Аминокислотная последовательность глюкагона (а) и ГПП-1 (б) (подчеркнуты совпадающие последовательности)

1	5	10	15
а) Гис-Сер-Гли-Тре-Фен-Тре-Сер-Арг-Тир-Сер-Лиз-Тир-Лей-			
Асп-			
б) Гис-Ала-Асп-Гли-Тре-Фен-Тре-Сер-Арг-Иле-Сер-Сер-Тир-Лей-			
Асп-			
16	20	25	29
а) -Сер-Арг-Арг-Ала-Гли-Асп-Фен-Вал-Гли-Три-Лей-Мет-Асп-Тре			
б) -Гли-Гли-Ала-Тре-Лиз-Глу-Фен-Вал-Ала-Три-Лей-Вал-Сер-			
Гли-Арг			

Основным источником глюкагона крови являются α -клетки островков Лангерганса. Секреция глюкагона снижается при потреблении пищи (см. рис. 7.7), при этом непосредственные ингибиторы секреции — инсулин и ГПП-1. Не исключается также возможность ингибирования секреции глюкагона метаболитами глюкозы. Аланин стимулирует секрецию глюкагона, но не инсулина.

Главным органом-мишенью для глюкагона служит печень. В ней он стимулирует распад гликогена и глюконеогенез. Рецептор глюкагона вместе с соответствующими G-белками активирует аденилатциклазу, а cAMP активирует cAMP-зависимые протеинкиназы.

Глюкоза не влияет на секрецию ГПП-1. По-видимому, основным стимулятором секреции ГПП-1 служит другой гормон — глюкозозависимый инсулиотропный пептид GIP. Этот гормон образуется в верхних отделах тонкой кишки, его секреция стимулируется при потреблении пищи: углеводов, жиров, белков, причем наиболее сильным стимулятором является глюкоза. Известно, что оральное введение глюкозы вызывает более сильную секрецию инсулина, чем внутривенные инъекции, при одинаковом повышении концентрации глюкозы в крови (инкретиновый эффект). Инкретиновый эффект объясняется следующей цепочкой событий: повышение концентрации глюкозы в кишечнике → стимуляция секреции GIP → стимуляция секреции ГПП-1 → стимуляция секреции инсулина. Быстрота реакции GIP на изменение концентрации глюкозы в кишечнике, анатомическая близость клеток, продуцирующих GIP и ГПП-1, прямой путь крови (следовательно, и ГПП-1) от кишечника к поджелудочной железе образуют эффективную кишечно-панкреатическую регуляторную петлю, с которой и связан инкретиновый эффект. Этот регуляторный механизм, как и соответствующий механизм β -клеток, имеет глюкозосенсорный аппарат, обеспечивающий изменение секреции GIP (следовательно, и ГПП-1) пропорционально концентрации глюкозы во внеклеточной жидкости.

ГПП-1 в своей активной форме ГПП-1 (7—36)-амид — мощный инсулиотропный пептид, стимулирует экспрессию гена проинсулина и секрецию инсулина. Кроме того, ГПП-1 оказывает и прямое инсулиноподобное действие: в экспериментах с изолированными клетками и тканями экспериментальных животных установлено, что ГПП-1 стимулирует синтез гликогена в печени и мышцах путем активации гликогенсинтазы. В мышцах стимулируется и потребление глюкозы. Рецепторы ГПП-1 найдены в островках Лангерганса, сердце, мозге, легких. У мышей с нуль-мутацией по гену рецептора ГПП-1 наблюдается гипергликемия натощак, снижены глюкозостимулируемая секреция инсулина и толерантность к глюкозе. Кроме того, ГПП-1 ингибирует секрецию глюкагона как у здоровых лиц, так и у больных диабетом.

Свойства ГПП-1, свидетельствующие о важной роли в регуляции метаболизма энергоносителей, служат основанием для попыток его применения при лечении больных сахарным диабетом.

7.4. ТРАНСДУКЦИЯ ИНСУЛИНОВОГО СИГНАЛА

Инсулиновый сигнал передается в клетку при посредстве мембранного рецептора инсулина

Рецептор инсулина (РИ) представляет собой тирозиновую протеинкиназу, т.е. протеинкиназу, фосфорилирующую белки по ОН-группе остатков тирозина. Это гликопротеин, построенный из двух α -субъединиц (мол. масса 130 000) и двух β -субъединиц (мол. масса 95 000); первые расположены целиком вне клетки, на ее поверхности, вторые пронизывают плазматическую мембрану (рис. 7.9). Центр связывания инсулина образуют N-концевые домены α -субъединиц. Каталитический Тир-протеинкиназный центр находится на внутриклеточных доменах β -субъединиц. В отсутствие инсулина ИР не проявляет тирозинкиназную активность. Присоединение инсулина к центру связывания на α -субъединицах активирует фермент, причем субстратом служит сам этот фермент, т.е. происходит аутофосфорилирование: фосфорилируются β -субъединицы РИ по нескольким тирозиновым остаткам.

Каталитическая субъединица РИ (β -субъединица), обладающая тирозинпротеинкиназной активностью, содержит короткий внеклеточный домен (О- и N-гликозилированный), трансмембранный домен (23 остатка) и большую внутриклеточную часть. В этой части имеется ряд остатков тирозина, подверженных фосфорилированию-дефосфорилированию (см. рис. 7.9). В позиции 1030 находится остаток лизина, входящий в каталитический активный центр — АТР-связывающий центр. Замена этого лизина на многие другие аминокислоты (путем экспериментального мутагенеза) уничтожает тирозинкиназную активность РИ, но не нарушает связывания инсулина. Однако присоединение инсулина к такому РИ никакого действия на клеточный метаболизм и пролиферацию не оказывает.

Каскад аутофосфорилирования РИ вовлекает 6 или 7 тирозиновых остатков, причем главные из них — остатки в позициях 1158, 1162 и 1163 (киназный регуляторный домен). При аутофосфорилировании одна β -цепь фосфорилирует другую β -цепь той же молекулы РИ. Кроме того, в β -субъединице есть ряд центров Сер/Тре-фосфорилирования, роль которых остается неясной. В некоторых исследованиях установлено, что Сер/Тре-фосфорилирование снижает сродство к инсулину и тирозинкиназную активность РИ.

Фосфорилирование β -субъединицы в свою очередь приводит к изменению субстратной специфичности фермента: теперь он способен фосфорилировать другие внутриклеточные белки — субстраты РИ: белки РИ-С1, Shc и некоторые другие. Ак-



Рис. 7.9. Строение рецептора инсулина.

тивация и изменение специфичности обусловлены конформационными изменениями РИ после связывания инсулина и аутофосфорилирования.

Многие модификации α -субъединиц в эксперименте (например, частичное расщепление протеазами) тоже приводят к появлению Тир-протеинкиназной активности. Это позволяет рассматривать α -субъединицу как регуляторную субъединицу фермента: в отсутствие инсулина эта субъединица ингибирует конститутивно активную каталитическую субъединицу (β -субъединицу).

Тирозинкиназные рецепторы — это семейство белков, включающее несколько классов. РИ относится к классу II, для представителей которого характерно наличие цистеинбогатого домена в α -цепи, а также гетеротетрамерность с -S—S-связями между протомерами. К этому же классу относится рецептор инсулиноподобного фактора роста I (ИФР-I), высокомолекулярный рецептор инсулина. Рецепторы класса I — мономерные, классов III и IV тоже мономерные, содержат иммуноглобулиноподобные повторы во внеклеточной части.

Таким образом, РИ — инсулинстимулируемая тирозинкиназа, строго контролируемая сложным каскадом аутофосфорилирования по тирозину (положительная регуляция) и по серину/треонину (возможно, отрицательная регуляция). Тирозинкиназа — обязательный посредник всех (или почти всех) плеiotропных действий инсулина, поскольку мутации в области связывания АТР вызывают утрату способности РИ к аутофосфорилированию и способности клетки реагировать на инсулин.

РИ обнаруживаются в клетках почти всех типов, но в разном количестве. Больше всего их в гепатоцитах (до 250 000 рецепторов в клетке) и в адипоцитах (до 50 000); в моноцитах

и эритроцитах их на порядок меньше. Концентрация инсулина в крови составляет 10^{-10} — 10^{-9} М, т.е. ниже, чем усредненное сродство связывания инсулина с рецептором, поэтому количество занятых рецепторов зависит не только от концентрации инсулина, но и от количества рецепторов на поверхности клетки. Клетки с различным содержанием рецепторов будут реагировать по-разному на одну и ту же концентрацию инсулина.

Связывание инсулина с рецептором служит также сигналом для начала перемещения комплекса инсулин/РИ из микроворсинков в те области клеточной поверхности, где нет микроворсинок. Этот процесс тоже требует лигандзависимого аутофосфорилирования β -субъединицы и активации киназы. Затем комплекс инсулин/РИ взаимодействует с клатринокаймленными ямками и интернализуется. Далее РИ или возвращается в плазматическую мембрану, или включается в лизосомы и разрушается. Во многих типах клеток инсулин стимулирует эндцитоз и деградацию РИ. Этот процесс можно рассматривать как механизм отрицательной регуляции действия инсулина: уменьшение количества РИ на мембране и, следовательно, ослабление сигналов, инициируемых инсулином, может быть существенным для клетки.

Синтез тетрамерной молекулы РИ кодируется одной мРНК, в результате трансляции образуется одна высокомолекулярная пептидная цепь. Посттрансляционная достройка начинается в эндоплазматическом ретикулуле: гликозилирование, образование внутрицепочечных и межцепочечных -S—S-связей. Далее в аппарате Гольджи происходит протеолитическая модификация: расщепление единой пептидной цепи, образование тетрамерной молекулы, концевое гликозилирование и ацилирование жирной кислотой.

*Активированный рецептор инсулина фосфорилирует
определенные цитоплазматические белки —
субстраты рецептора*

Известно несколько субстратов РИ: РИ-С1, РИ-С2, Shc, а также некоторые белки семейства STAT (signal transducer and activator of transcription — переносчики сигнала и активаторы транскрипции). Они активируют разные сигнальные пути. Субстрат 1 рецептора инсулина (РИ-С1) главный. Этот цитоплазматический белок фосфорилируется по остаткам тирозина немедленно после стимуляции инсулином. Фосфорилирование субстрата РИ ведет к плейотропной реакции клетки на инсулиновый сигнал. От степени фосфорилирования субстрата зависят увеличение или уменьшение клеточного ответа на инсулин, амплитуда изменений в клетках и чувствительность к гормону. Мыши лабораторной линии, лишенные гена РИ-С1,

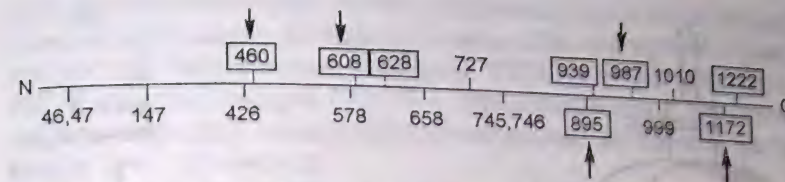


Рис. 7.10. Строение субстрата 1 рецептора инсулина.

Числа — позиции тирозиновых остатков; в рамках — фосфорилируемые тирозиновые остатки; стрелки — места предпочтительного связывания белков, содержащих SH2-домены.

проявляют резистентность к инсулину и сниженную толерантность при нагрузке глюкозой. Это указывает на то, что повреждения гена РИ-С1 могут быть причиной ИНСД.

Пептидная цепь РИ-С1 (рис. 7.10) содержит несколько больше 1200 аминокислотных остатков, 20—22 потенциальных центров фосфорилирования по тирозину и около 40 центров Сер/Тре-фосфорилирования. В базальном состоянии РИ-С1 фосфорилирован по серину (в меньшей мере по треонину); после стимуляции инсулином степень фосфорилирования и по тирозину, и по серину существенно увеличивается. РИ-С1 является также субстратом инсулиноподобного фактора роста (ИФР-I), который фосфорилирует его по тем же местам, что и РИ. Рецепторы ряда других факторов роста (например, PDGF, EGF, CSF-1) не фосфорилируют РИ-С1.

Фосфорилирование РИ-С1 по нескольким тирозиновым остаткам придает ему способность соединяться с рядом белков, содержащих SH2-домены. К таким белкам, в частности, относятся Nck, тирозинфосфатаза *src*, p85-субъединица ФИ-3-киназы, адапторный белок Grb2, протеинтирозинфосфатаза SH-PTP2, фосфолипаза C_2 , GAP (активатор малых ГТФ-связывающих белков). В результате взаимодействия РИ-С1 с подобными белками генерируются множественные нисходящие сигналы.

Нековалентное соединение белков происходит за счет взаимодействия SH2-доменов с аминокислотными последовательностями РИ-С1, содержащими фосфорилированный тирозиновый остаток. При этом не любые белки, содержащие домены SH2, присоединяются к РИ-С1: например, не присоединяется фосфолипаза C_2 или GAP. Избирательность ассоциации определяется аминокислотной последовательностью в области фосфорилированного остатка тирозина (домены SH2 связывают с небольшим сродством и свободный фосфотирозин). Таким путем могут образовываться многокомпонентные комплексы белков, участвующих в трансдукции сигнала. Этот механизм не является специфической особенностью инсулиновой сигнализации: при трансдукции сигналов, поступающих от

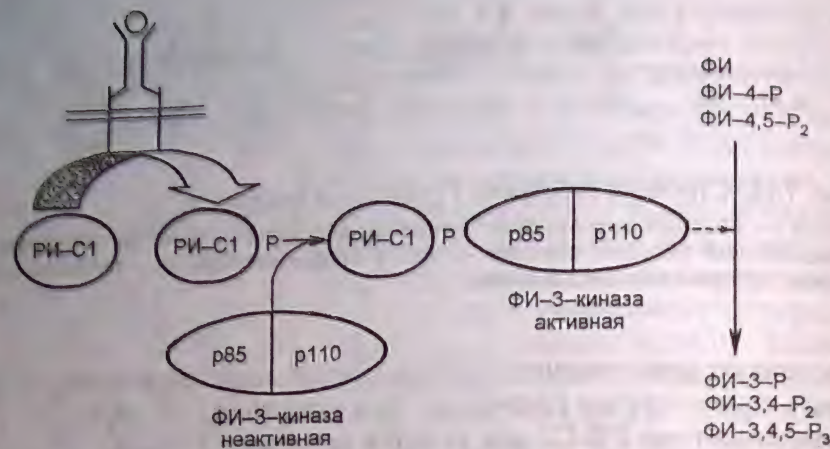


Рис. 7.11. Активация фосфатидилинозитол-3-киназы.

рецепторов факторов роста, цитокинов и др., тоже образуются комплексы с белками, содержащими домены SH2.

В некоторых белках, содержащих SH2-домены, а также в цитоскелетных белках найдены SH3-домены; эти домены могут взаимодействовать с пролинбогатыми последовательностями других белков.

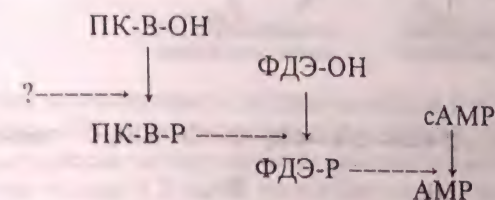
Инсулиновый сигнал активирует фосфатидилинозитол-3-киназу

Инсулин при посредничестве РИ-С1 активирует фосфатидилинозитол-3-киназу (ФИ-3-киназа). Последняя катализирует фосфорилирование ФИ, ФИ-4-фосфат и ФИ-4,5- P_2 по позиции 3 — образуются соответственно ФИ-3-Р, ФИ-3,4- P_2 и ФИ-3,4,5- P_3 (рис.7.11). Фермент представляет собой гетеродимер, содержащий регуляторную (p85) и каталитическую (p110) субъединицы. В регуляторной субъединице есть два SH2-домена и SH3-домен, поэтому ФИ-3-киназа с высоким сродством присоединяется к РИ-С1. Изолированные домены SH2, полученные из p85 (регуляторной субъединицы), ингибируют образование комплекса с цельной ФИ-3-киназой. Из этого следует, что фермент присоединяет РИ-С1 своей регуляторной субъединицей. При образовании комплекса ФИ-3-киназа активируется.

Активация ФИ-3-киназы является звеном сигнального пути, стимулирующего транслокацию ГЛЮТ-4 из цитозоля в плазматическую мембрану, а следовательно, и трансмембранный перенос глюкозы в мышечные и жировые клетки. Ингибиторы ФИ-3-киназы подавляют и базальное, и стимулированное инсулином потребление глюкозы; в последнем случае ингибируется транслокация ГЛЮТ-4 к мембране. В исследованиях с

культурами мышечных клеток получены результаты, позволяющие предполагать следующую цепь событий при стимуляции инсулином потребления глюкозы: РИ-С1 \rightarrow ФИ-3-киназа \rightarrow ПК-С \rightarrow транслокация ГЛЮТ-4. Протеинкиназа С *in vitro* прямо активируется полифосфоинозитами. Механизм активации *in vivo* неизвестен.

В жировых клетках активация ФИ-3-киназы инсулином приводит к ингибированию липолиза. Лимитирующей стадией липолиза в адипоцитах является реакция, катализируемая гормончувствительной липазой, которая активна в фосфорилированной форме (сАМР-зависимое фосфорилирование). При стимуляции инсулином концентрация сАМР в адипоцитах снижается в результате следующего каскада реакций: фосфорилируется (и активируется) протеинкиназа В (ПК-В), которая фосфорилирует (и тоже активирует) фосфодиэстеразу сАМР:



При низкой концентрации сАМР липаза находится в нефосфорилированном неактивном состоянии. Кратко сигнальный путь от инсулина до фосфодиэстеразы можно представить так: инсулин/ФИ-3-киназа/.../ПК-В/ФДЭ. Промежуточные звенья между ФИ-3-киназой и ПК-В не изучены.

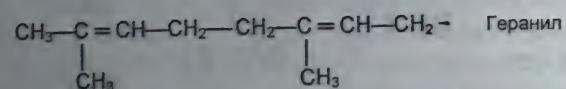
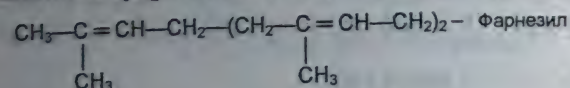
Многие факторы роста стимулируют ФИ-3-киназу, но не влияют на обмен глюкозы. Это указывает на то, что разные сигнальные входы имеют специфические механизмы для использования ФИ-3-киназной системы, чтобы генерировать специфический конечный ответ.

Инсулин и факторы роста, действующие через Тир-киназные рецепторы, активируют ФИ-3-киназы класса I, построенные из каталитической субъединицы с мол. массой 110 000 и адапторной субъединицы p85 (см. рис. 7.11). В инсулинзависимых тканях найдены две формы каталитической субъединицы — p110 α и p110 β . Известны также две формы адапторной субъединицы — p85 α и p85 β с высокой гомологией аминокислотной последовательности и пространственной структуры: каждая из них содержит два SH-домена, два пролинбогатых домена, SH3-домен и Всг-гомологичный домен. Кроме того, обнаружено несколько укороченных форм адапторной субъединицы: они не содержат SH3-домена, Всг-гомологичного домена и одного из пролинбогатых доменов. В адипоцитах человека экспрессируется только адапторная субъединица p85 α ,

в то время как в клетках скелетных мышц 7 вариантов: p85 α , p85 β и пять укороченных. Разные варианты адапторных белков не в одинаковой мере включаются в фосфотирозиновые комплексы при инсулиновой стимуляции. Эти результаты указывают на возможность разветвления сигнального пути вследствие избирательной мобилизации определенного варианта адапторного белка (или определенного набора адапторных белков) в зависимости от природы первичного стимула.

Инсулин активирует сигнальный путь Ras

Белки Ras входят в суперсемейство малых GTP-связывающих белков. Это небольшие белки (мол. масса 21 000, около 190 аминокислотных остатков), содержащие на С-конце ковалентно связанный фарнезилый или геранильный остаток:



С помощью такого гидрофобного конца белки Ras (p21^{ras}) прикрепляются к внутренней поверхности плазматической мембраны. Ras вовлечены в разнообразные клеточные процессы, включая везикулярный транспорт, функции шаперонов, пролиферацию.

Как и все GTP-связывающие белки, Ras регулируются циклом GTP-белок (активная форма) \leftrightarrow GTP-белок (неактивная форма). В этих превращениях участвуют и другие белки: GAP (GTPase activating factor), GEF (GTF exchange factor) и SOS; два последних белка обеспечивают отделение GTP от Ras и присоединение GTP.

В покоей клетке белок p21^{ras} находится преимущественно в неактивной GTP-форме. Стимуляция клетки инсулином (а также другими факторами роста и митогенами) приводит к быстрому увеличению количества активной GTP-формы. Происходит это следующим образом. Небольшой цитозольный белок Grb-2, содержащий SH2- и SH3-домены, может нековалентно присоединяться к фосфорилированному РИ в области определенных фосфотирозиновых остатков (рис. 7.12). Этому способствует один из субстратов РИ, а именно Shc. Далее образовавшийся комплекс взаимодействует с другим комплексом, содержащим белок Ras (p21^{ras}). Белки Grb2 и Shc называют также адапторными белками, поскольку они связывают тирозинкиназные рецепторы (в данном случае РИ) с белком

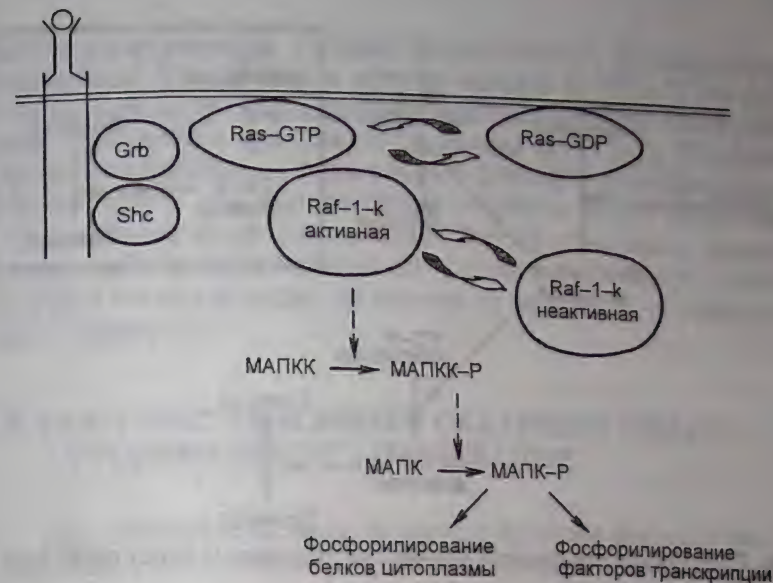


Рис. 7.12. Активация инсулином сигнального пути Ras/МАПК. Показаны не все белки. Пространственное расположение "грозди" белков отобразить на плоскости невозможно: например, активная Raf-1-k контактирует не только с Ras-TP, но и с плазматической мембраной, рецептором инсулина и некоторыми другими белками.

Ras. В комплекс также включаются белки, обеспечивающие обмен GDP/GTP и активацию Ras (SOS, GAP, GEF, OST). На цитоплазматической части рецептора инсулина образуется большая «гроздь» взаимодействующих белков. Таким образом, инсулин активирует белок Ras и инсулиновый сигнальный путь соединяется с сигнальным путем Ras.

Активация Ras является конечным звеном трансмембранной передачи сигнала и начальным звеном цитоплазматических и ядерных сигнальных путей. Эти пути составляют каскад протеинкиназных реакций с участием протеинкиназы Raf-1, МАПКК (митогенактивируемой протеинкиназы киназа) и МАПК (митогенактивируемые протеинкиназы).

Активированный Ras приобретает способность соединяться с протеинкиназой Raf-1. Последняя находится в цитозоле в соединении с некоторыми белками теплового шока и в этом состоянии не обладает протеинкиназной активностью; фермент активируется в результате соединения с белком Ras (см. рис 7.12). Этот процесс сложен. Для полной активации Raf-1 требуются его присоединение к плазматической мембране, фосфорилирование по тирозиновым остаткам ферментом саркокиназой (Src), фосфорилирование по сериновым и треони-

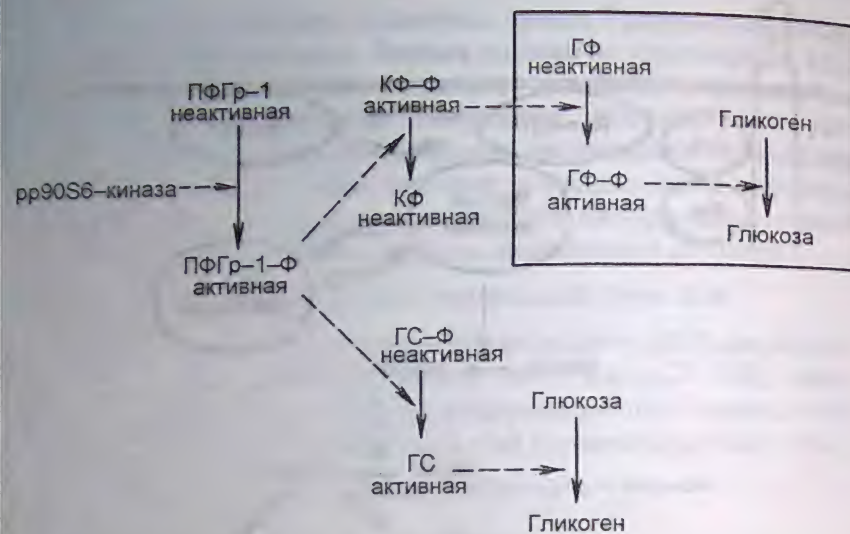


Рис. 7.13. Регуляция синтеза гликогена инсулином через сигнальный путь Ras.

ПФГр-I — протеинфосфатаза гранул гликогена; КФ — киназа гликогенфосфорилазы; ГФ — гликогенфосфорилаза; ГС — гликогенсинтаза. В рамке — процессы, которые при стимуляции клетки инсулином прекращаются вследствие дефосфорилирования киназы ГФ.

новым остаткам специфической протеинкиназой С, а также взаимодействие с рецептором инсулина. Таким образом, в этот момент «гроздь» белков на рецепторе инсулина увеличивается.

Активированная протеинкиназа Raf-1 фосфорилирует (активирует) МАПКК, которая фосфорилирует МАПК. Активированная МАПК фосфорилирует определенные белки цитоплазмы (в частности, протеинкиназу pp90S6, фосфолипазу A2 и рибосомальную киназу).

Сигнал может передаваться и в ядро, обеспечивая регуляцию транскрипции определенных генов: фосфорилированная МАПК фосфорилирует (активирует) ряд факторов транскрипции.

Путь Ras активируется не только инсулином и его рецептором, но и многими другими гормонами, факторами роста и их рецепторами. С этими процессами, в частности, связаны клеточная пролиферация и трансформация. Однако конечный ответ клетки на разные сигналы бывает различным, оказывается специфичным для данного первого вестника сигнала. Это объясняется, в частности, наличием вариантов белков (семейства), участвующих в трансдукции сигнала.

Активация пути Ras инсулином наряду с другими ответами клетки вызывает изменение обмена гликогена (рис. 7.13).

Одним из ферментов каскада протеинкиназ, активируемых комплексом Ras, является протеинкиназа pp90S6. Этот фермент катализирует Сер/Тре-фосфорилирование протеинфосфатазы, связанной с гранулами гликогена (ПФГр-1). Фосфорилированная (активная) форма ПФГр-1-фосфат дефосфорилирует (активирует) гликогенсинтазу (ускоряется синтез гликогена), а также киназу фосфорилазы и гликогенфосфорилазу (прекращается мобилизация гликогена). Таким длинным путем инсулиновый сигнал доходит до одного из конечных — эффекторных — звеньев.

7.5. ИНСУЛИНЗАВИСИМЫЙ САХАРНЫЙ ДИАБЕТ — АУТОИММУННОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ

При инсулинзависимом сахарном диабете происходит разрушение β -клеток в результате аутоиммунной реакции

Гипергликемия и другие первичные симптомы ИЗСД обусловлены дефицитом инсулина, который в свою очередь вызван уменьшением количества β -клеток (а также панкреатических островков) в поджелудочной железе. Множество экспериментальных и клинических исследований указывает на то, что разрушение островков происходит в результате клеточной аутоиммунной реакции.

При манифестации, т.е. первом клиническом проявлении, ИЗСД почти всегда обнаруживается воспалительная реакция в поджелудочной железе — инсулит. Панкреатический инфильтрат при ИЗСД содержит Т- и В-лимфоциты, натуральные киллеры и макрофаги. При этом инфильтрат образуется только в тех островках, в которых есть β -клетки. В островках, продуцирующих глюкагон, соматостатин, но не содержащих β -клеток, инфильтрата нет. Такая локальность, точечность реакции указывает на то, что причиной ее являются компоненты и свойства, присущие только β -клеткам. Как показывают многие наблюдения, специфичность повреждения β -клеток может быть следствием клеточной аутоиммунной реакции.

Клеточный иммунитет. Основными молекулами, обеспечивающими клеточный иммунитет, являются Т-рецепторы и белки главного комплекса гистосовместимости (белки ГКГ). Эти два семейства молекул принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов, в которое входит также семейство иммуноглобулинов-антител, давших название всему суперсемейству. В отличие от антител, находящихся в жидкостях организма в растворенном состоянии, Т-рецепторы и белки ГКГ — это интегральные белки клеточных мембран. Т-рецепторы имеются

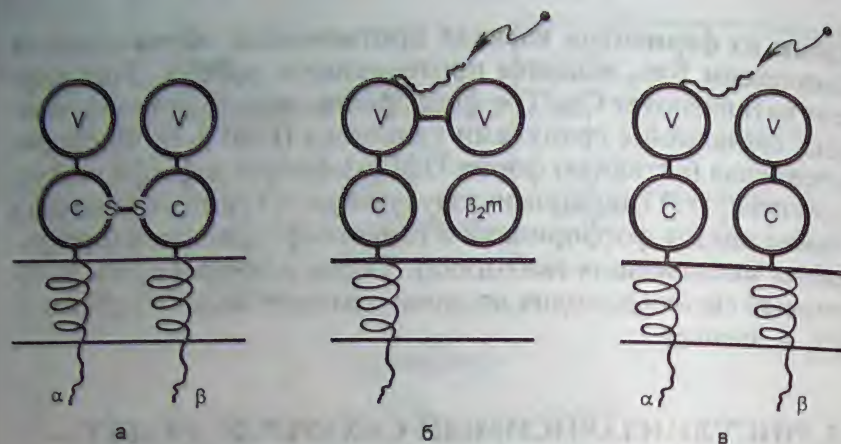


Рис. 7.14. Строение Т-рецепторов (а) и белков ГКГ классов I (б) и II (в).

Стрелки указывают на пептиды — лиганды белков; V — переменные домены; С — постоянные домены.

на поверхности Т-лимфоцитов, а белки ГКГ — на поверхности практически всех клеток.

Т-рецепторы представляют собой гетеродимеры $\alpha\beta$ с межцепочечной дисульфидной связью. Каждая цепь содержит глобулярные переменный и постоянный домены, экспонированные на наружной поверхности мембраны, а также трансмембранный домен и короткий цитоплазматический домен (рис. 7.14). Т-рецептор составляет часть многомолекулярного белкового комплекса, включающего 7—9 пронизывающих мембрану пептидных цепей. Этот комплекс формируется в цитозоле и затем включается в мембрану. Существует множество клонов Т-лимфоцитов, различающихся по структуре переменного домена, т.е. множество Т-рецепторов с разной специфичностью к лигандам. Разнообразие Т-рецепторов возникает так же, как и разнообразие антител, т.е. в результате соматической рекомбинации генов. Лигандами для Т-рецепторов служат короткие пептиды (10—20 аминокислотных остатков), которые образуются из чужеродных белков в результате протеолитической фрагментации. При этом для узнавания рецепторами необходимо, чтобы такие пептиды были соединены с белками ГКГ (см. рис. 7.14, б, в).

Известно 2 класса белков ГКГ, несколько различающихся по структуре и функциям. Белки класса I содержат две нековалентно связанные пептидные цепи — легкую и тяжелую. Тяжелая цепь своей большой N-концевой частью экспонирована на наружной поверхности клеточной мембраны, далее следуют небольшие трансмембранный и цитоплазматический

домены. Легкая цепь представлена β_2 -микроглобулином (β_2m). Внеклеточная часть тяжелой цепи содержит три глобулярных домена: переменные домены α_1 , α_2 и α_3 — постоянный домен, сходный по структуре с пептидом β_2m .

Белки ГКГ класса II — это гомодимеры; на поверхности клетки экспонированы переменный и постоянный глобулярные домены обеих цепей.

Белки ГКГ класса I имеются практически во всех клетках организма человека, а класса II — только в макрофагах, В-лимфоцитах и некоторых специализированных эпителиальных клетках. В геноме человека есть несколько генов (генные локусы) белков ГКГ (гены HLA), однако в популяциях человека известно большое количество аллельных вариантов этих белков — варианты белков класса I и II. Отдельные индивиды могут наследовать только один (гомозиготы) или два (гетерозиготы) из этих вариантов, причем вероятность наследования разными индивидами одинаковых вариантов ничтожна. Таким образом, между людьми существуют индивидуальные различия по белкам ГКГ. Именно с этим связана трансплантационная несовместимость индивидов.

Белки ГКГ являются рецепторами небольших пептидов (длиной в 10—20 аминокислотных остатков). Центр связывания этих пептидов образуют переменные домены белков ГКГ. Пептиды-лиганды могут образоваться в результате протеолитической фрагментации как собственных белков организма, так и чужеродных белков; в последнем случае пептиды-лиганды служат антигенами, вызывают иммунную реакцию с участием Т-лимфоцитов. К пептидам, образовавшимся из собственных нормальных (не мутантных) белков, на ранних стадиях эмбрионального развития вырабатывается иммунологическая толерантность.

Комплекс белка ГКГ с пептидом служит лигандом Т-рецептора определенного клона Т-лимфоцитов. Т-лимфоцит своим Т-рецептором присоединяется к клетке, представившей на своей поверхности комплекс ГКГ/пептид. Если пептид в этом комплексе происходит не из собственного, а из чужеродного белка, то Т-лимфоцит активируется и включается механизм уничтожения клетки, несущей чужеродный пептид. Следует подчеркнуть, что Т-рецептор связан не отдельно с белком ГКГ и не отдельно с пептидом-антигеном, а именно с комплексом этих молекул, которые вместе и в равной мере участвуют в образовании центра связывания для Т-рецепторов. Таким образом, специфичность иммунного ответа есть результат переменности белков ГКГ, которые определяют выбор пептида-антигена и выбор Т-лимфоцита соответствующего клона.

В организме человека Т-лимфоциты представлены 3 типа-

ми: цитотоксические Т-лимфоциты (Т-киллеры), имеющие механизм уничтожения клеток, и два типа лимфоцитов, выполняющих регуляторные функции — Т-хелперы и Т-супрессоры. Т-хелперы, присоединившие антиген, стимулируют остальные компоненты иммунной системы: специфичные к данному антигену другие Т-лимфоциты, а также В-лимфоциты. Т-супрессоры, наоборот, подавляют активность этих клеток. Т-хелперы, вероятно, играют главную роль в инициации иммунного ответа. В частности, пролиферация и окончательная дифференцировка В-лимфоцитов, узнавших чужеродный антиген, требуют активации Т-лимфоцитами.

Чужеродные белки могут появиться в клетке двумя путями: 1) образоваться в самой клетке (вирусные белки, мутантные белки); 2) проникнуть путем эндоцитоза в клетки макрофагов и некоторых других фагоцитирующих клеток (любые белки, появляющиеся в жидкостях организма). Ответ клеточного иммунитета в этих случаях будет несколько различным.

Иммунный ответ на эндогенные и эндоцитированные белки

Эндогенные чужеродные белки	Эндоцитированные чужеродные белки
Фрагментируются в тех же клетках, в которых образовались	Фрагментируются в макрофагах (или в других клетках, которые их эндоцитировали)
Пептиды образуют комплексы с белками ГКГ класса I	Пептиды образуют комплексы с белками ГКГ класса II
В образовании комплексов участвуют вспомогательные белки CD8	В образовании комплексов участвуют вспомогательные белки CD4
С комплексами белок класса I/пептид взаимодействуют рецепторы антигенспецифического клона Т-киллеров	С комплексами белок класса II/пептид взаимодействуют рецепторы антигенспецифического клона Т-хелперов
Т-киллер разрушает клетку, несущую чужеродный пептид-антиген	Т-хелперы активируют клетки клона антигенспецифических Т-киллеров, которые разрушают клетки, несущие чужеродный пептид-антиген

На рис. 7.15 приведена схема инициации клеточного иммунного ответа на эндоцитированный чужеродный белок. Антиген (Аг), обычно растворимый белок, часто гликопротеин, эндоцитируется антигенпредставляющими клетками (АПК; например, тканевыми макрофагами или В-лимфоцитами). В эндоцитозе участвует рецептор антигена на поверхности АПК. Комплекс Аг/рецептор интернализуется, в эндосоме происходит частичный протеолиз чужеродного белка с образованием пептидов длиной в 10—20 аминокислотных остатков, пептиды соединя-

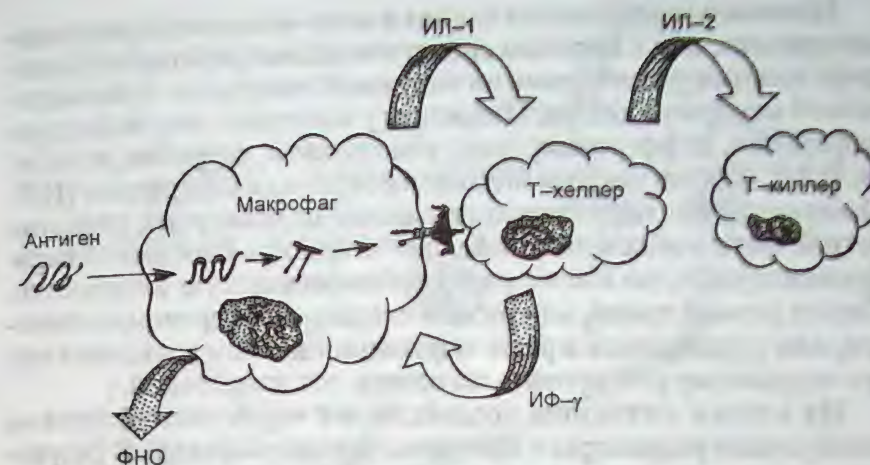


Рис. 7.15. Инициация клеточного иммунного ответа.

ются с белками класса II ГКГ. Затем эндосома сливается с плазматической мембраной и комплекс антигенный пептид/ГКГ класса II экспонируется на поверхности клетки. Экспонированный комплекс может быть распознан Т-хелперами специфического клона, несущими подходящий Т-рецептор.

Как только Аг узнается Т-хелпером, последний активируется прежде всего в отношении транскрипции ряда цитокиновых генов, продукция цитокинов (см. далее) вызывает хемотаксис лейкоцитов к месту, где происходят эти события, активацию эндотелиальных клеток, пролиферацию и дифференцировку рекрутированных лейкоцитов, апоптоз и много других биологических активностей.

Интерлейкин-1 может быть токсичным для β-клеток

В развитии клеточной аутоиммунной реакции участвуют цитокины. Это сигнальные молекулы пара- и аутокринного действия, но некоторые из них иногда встречаются в крови и в физиологически активной концентрации. Известны десятки разных цитокинов. К ним относятся интерлейкины (лимфокины и монокины), интерфероны, пептидные факторы роста, колониестимулирующие факторы. Цитокины представляют собой гликопротеины, содержащие 100—200 аминокислотных остатков. Большинство цитокинов образуется и действует во многих типах клеток и реагирует на разные стимулы, включая механическое повреждение, вирусную инфекцию, метаболические нарушения и др. Исключение составляют интерлейкины (ИЛ-1α и ИЛ-1β), их синтез регулируется специфическими сигналами и в небольшом количестве типов клеток.

Цитокины содержатся в тканях в пико- и наномолярных концентрациях, они с высоким сродством взаимодействуют со специфическими рецепторами на наружной поверхности плазматической мембраны клеток. Цитокины участвуют в регуляции пролиферации, дифференцировки, хемотаксиса, секреции, апоптоза. ИЛ-1, фактор некроза опухолей (ФНО- α) и интерферон (ИФ- γ) являются соответственно главными медиаторами развития острой фазы воспаления, инфекции и травмы. Они имеют перекрывающуюся, но все же разную биологическую активность. Клетки разных типов, или разной степени дифференцированности, или находящиеся в разном функциональном состоянии могут по-разному реагировать на один и тот же цитокин.

На клетки цитокины воздействуют через специфические мембранные рецепторы и протеинкиназные каскады. В результате этого воздействия активируется фактор транскрипции — белок, который транслоцируется в ядро клетки, находит специфическую последовательность ДНК в промоторе гена, являющегося мишенью данного цитокина, и активирует этот ген.

В экспериментах с изолированными панкреатическими островками животных показано, что ИЛ-1 практически полностью подавляет стимулированную глюкозой секрецию инсулина и нарушает нормальную структуру островков. В островках снижается выживаемость клеток, отмечается фрагментация ДНК, уменьшается содержание ДНК, т.е. индуцируется апоптоз. Повреждаются преимущественно β -клетки; вероятно, это связано с тем, что в островках именно β -клетки имеют наибольшую плотность рецепторов ИЛ-1. Глюкоза защищает клетки от токсического действия ИЛ-1 (увеличивает выживаемость клеток), при этом индуцируется синтез белков, в частности bcl-2, ингибирующего апоптоз.

Цитокины ИФ- γ и ФНО- α усиливают токсическое действие ИЛ-1: в их присутствии ИЛ-1 токсичен для островков в гораздо меньших концентрациях. Другие цитокины не оказывают токсического действия на островки.

ИЛ-1 индуцирует, в частности, синтез фермента NO-синтазы (NOS). Оксид азота NO — короткоживущий свободный радикал с высокой реакционной способностью. Он участвует в регуляции ряда физиологических функций: например, регулирует тонус сосудов (сосудорасширяющее действие), оказывает противопухоловое действие, токсичен для микроорганизмов. NO образуется при действии NOS, превращающей аргинин и кислород в цитруллин и NO. Есть две основные разновидности NOS: конститутивная форма (обнаружена в основном в нейронах и эндотелиальных клетках) и индуцибельная форма (iNOS) (во многих клетках, в том числе в β -клетках островков). Синтез iNOS индуцируется цитокинами и бакте-

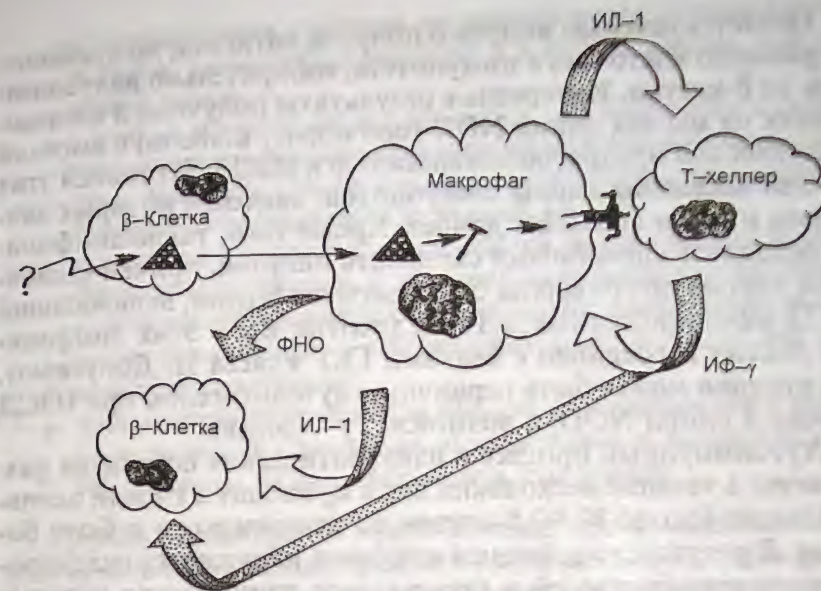


Рис. 7.16. Модель аутоиммунной гибели β -клеток.

риальными липополисахаридами; фермент продуцирует значительно больше NO, чем конститутивные формы. По-видимому, iNOS служат одним из механизмов защиты от микроорганизмов: NO оказывает летальное действие на простейшие, бактерии и вирусы.

В островках Лангерганса iNOS образуется, вероятно, только в β -клетках. Синтез mPNC и белка iNOS в панкреатических островках у человека индуцируется при одновременном наличии двух или трех цитокинов: ИЛ-1 β + ИФ- γ или ИЛ-1 β + ИФ- γ + ФНО- α . В целом повреждение и гибель β -клеток при аутоиммунной реакции можно представить следующим образом (рис. 7.16). В ранней фазе иммунного ответа происходит взаимодействие одной АПК с одной Ag-узнающей клеткой. При этом повышается локальная концентрация цитокинов с паракринным действием на ближайшее окружение. Позднее развивается воспалительная реакция с участием активных иммунокомпетентных клеток, происходят секреция цитокинов, активация протеаз, образование кислородных радикалов, других иммунных медиаторов. Таким образом, гибель клеток наступает, по-видимому, как по механизму некроза (воспаление), так и по механизму апоптоза.

Интерферон γ (ИФ- γ) обеспечивает положительную обратную связь с макрофагами в отношении продукции ИЛ-1 и ФНО- α , вследствие чего начавшийся с одной клетки иммунный ответ не затухает, а амплифицируется.

Остается неясным вопрос о природе антигена, запускающего реакцию клеточного иммунитета, избирательно направленную на β -клетки. Интересные результаты получены в исследованиях на мышах линии NOD (non obesity diabetes) с высокой генетической предрасположенностью к ИЗСД. Из тканей этих мышей выделены клоны лимфоцитов, введение которых здоровым мышам вызывает диабет. Кроме того, такие лимфоциты оказались способными связывать инсулин, причем узнаваемой частью почти всегда был фрагмент β -цепи, включающий 9—23 аминокислотных остатка (пептид В). В этих лимфоцитах пептид В соединен с белками ГКГ класса II. Допускают, что инсулин может быть первичным аутоантигеном при ИЗСД у мышей линии NOD, а возможно, у человека.

Аутоиммунный процесс в панкреатических островках развивается в течение нескольких лет и приводит к гибели основной массы (около 80 %) β -клеток до клинического дебюта болезни. В результате дефицита инсулина нарушается складирование энергоносителей и проявляется клиническая картина ИЗСД.

7.6. НАРУШЕНИЕ СИНТЕЗА ГЛИКОГЕНА И ЖИРОВ ПРИ ДЕФИЦИТЕ ИНСУЛИНА

При сахарном диабете инсулин-глюкагоновый индекс снижен. Это связано не только с уменьшением секреции инсулина, но и с увеличением секреции глюкагона (инсулин ингибирует секрецию глюкагона). В результате оказывается ослабленной стимуляция процессов складирования и усиленной стимуляция мобилизации запасов, причем настолько, что печень, мышцы, жировая ткань даже после приема пищи функционируют в режиме постабсорбтивного состояния (см. рис. 7.4). При этом продукты переваривания, а также их метаболиты, вместо того чтобы складироваться в форме гликогена и жиров, циркулируют в крови. Вероятно, в какой-то мере происходят и затратные циклические процессы типа одновременно протекающих гликолиза и глюконеогенеза или синтеза и распада жиров и т.п.

Для всех форм сахарного диабета характерна сниженная толерантность к глюкозе, т.е. гиперглюкоземия после приема пищи или даже натошак.

Основные причины гиперглюкоземии:

- ▲ потребление глюкозы мышцами и жировой тканью ограничено, поскольку в отсутствие инсулина GLUT-4 не экспонирован на поверхности миоцитов и адипоцитов.

Следовательно, глюкоза не используется для запасаения в форме гликогена в мышцах и в форме жиров — в жировой ткани;

- ▲ в печени глюкоза не используется для запасаения в форме гликогена, поскольку при низкой концентрации инсулина и высокой глюкагона гликогенсинтаза находится в фосфорилированной неактивной форме;
- ▲ в печени глюкоза не используется и для синтеза жиров: ферменты гликолиза и пируватдегидрогеназы находятся в неактивной форме и, следовательно, заторможено превращение глюкозы в ацетил-СоА, необходимый для синтеза жирных кислот;
- ▲ путь глюконеогенеза при низкой концентрации инсулина и высокой глюкагона активирован и возможен синтез глюкозы из аминокислот и глицерина.

Другим характерным признаком сахарного диабета является повышенная концентрация в крови липопротеинов (главным образом ЛОНП), свободных жирных кислот и, главное, кетонных тел. Это связано с тем, что пищевые жиры не депонируются в жировой ткани, поскольку сАМР-зависимая липаза адипоцитов находится в фосфорилированной (активной) форме. Отсюда и повышенное содержание свободных жирных кислот в крови. Жирные кислоты поглощаются печенью, часть их превращается в адипоцитах в триацилглицерины, которые в составе ЛОНП секретируются в кровь. Другая часть жирных кислот вступает в путь β -окисления в митохондриях печени, и образующийся ацетил-СоА используется для синтеза кетонных тел.

7.7. КОМАТОЗНЫЕ СОСТОЯНИЯ (ОСТРЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ) ПРИ ДИАБЕТЕ КАК РЕЗУЛЬТАТ НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА ГЛЮКОЗЫ И ЖИРОВ

При сахарном диабете возможны три основные формы коматозных состояний: *кетацидотическая кома* с абсолютной инсулиновой недостаточностью; *гиперосмолярная кома* с умеренной недостаточностью инсулина; *лактацидотическая кома* с выраженной гипоксией, сепсисом, сердечно-сосудистым шоком. Кроме того, при инсулинотерапии может быть гипогликемическая кома, связанная с передозировкой инсулина. Первые три состояния могут развиваться не только при сахарном диабете, но и при действии многих других факторов (токсических, инфекционных и др.).

Три основные формы коматозного состояния практичес-

ки никогда не встречаются по отдельности. Обычно преобладают проявления какой-нибудь одной из форм (часто гиперосмолярной), что и дает повод для выделения основных форм.

Первичной причиной кетоацидоза является инсулиновая недостаточность: в период комы С-пептид и иммунореактивный инсулин (ИРИ) в крови не определяются. Гипергликемия отмечается всегда (20—30 ммоль/л, иногда более). Ацидоз при диабетической коме — это следствие накопления органических кислот: кетоновых тел, а также лактата и пирувата. Концентрация кетоновых тел достигает 2 ммоль/дл (в 200 раз больше нормы); она повышается не только вследствие синтеза в печени, но и потому, что снижается экскреция кетоновых тел в связи с олигурией и анурией, которая часто бывает при коме. Снижение рН крови до 7 и ниже (норма 7,4) наблюдается всегда.

Развивается дегидратация: дефицит воды может быть до 10 % от общей массы тела. Количество циркулирующей жидкости уменьшается на 25—30 %, в результате чего снижается артериальное давление.

Кислородное и энергетическое голодание миокарда, уменьшение объема крови ведут к сердечно-сосудистой недостаточности. Возможны повышение свертываемости крови, инфаркт миокарда, инфаркты паренхиматозных органов, инсульт, периферические тромбозы.

Диабетическая кома развивается медленно, в течение нескольких дней, иногда может возникнуть за несколько часов. Появляются тошнота, рвота, черты лица заостряются, глаза западают, нарастают безучастность к окружающему, заторможенность, переходящая в глубокую кому (полностью выключенное сознание, отсутствие рефлексов, атония мышц и др.). В помещении, где находится больной, ощущается запах ацетона. Артериальное давление снижено, почти всегда наблюдается олигурия или анурия.

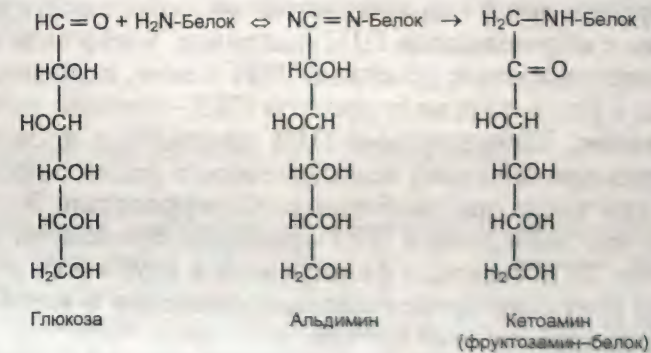
Диабетическая кома требует немедленного проведения следующих мероприятий: 1) ликвидация инсулиновой недостаточности путем введения инсулина в дозах, обеспечивающих постепенное снижение концентрации глюкозы в крови до уровня, близкого к нормальному; 2) регидратация организма путем введения жидкости; 3) восстановление нормального солевого состава и рН жидкостей организма путем введения соответствующих солевых растворов; 4) восстановление запасов гликогена в организме.

Проявления комы обычно ликвидируются в течение 2—3 дней при непрерывно продолжающемся лечении, причем лечение в начальные часы имеет решающее значение для больного.

До развития методов лечения диабета инсулином больные умирали вскоре после начала болезни от диабетической комы. Однако и в настоящее время кома наблюдается нередко. В частности, первое проявление болезни в 15—30 % случаев сопровождается кетоацидозом и комой. Смертность от диабетической комы остается высокой — от 1 до 30 %. Основной причиной смерти больных диабетом в настоящее время являются поздние осложнения.

7.8. ГЛИКИРОВАНИЕ БЕЛКОВ — ОДНА ИЗ ГЛАВНЫХ ПРИЧИН ПОЗДНИХ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Поздние осложнения сахарного диабета связаны прежде всего с повреждением кровеносных сосудов (диабетические ангиопатии). Основной механизм повреждения тканей — гликирование (гликозилирование) белков — неферментативная реакция глюкозы со свободными аминогруппами белковой молекулы (Лиз, Арг, N-концевая аминокислота):



Вначале образуется нестабильная альдиминовая группировка, которая может превращаться в ряд других, более стабильных соединений («ранние продукты гликозилирования»). Понятно, что функции белка могут быть нарушены в результате изменения заряда белковой молекулы, ее конформации или блокирования активного центра. Гликозилирование — медленная реакция, в тканях здоровых людей обнаруживаются лишь небольшие количества гликозилированных белков. При гипергликемии реакция существенно ускоряется. Например, у больных диабетом в состоянии гипергликемии содержание одного из гликозилированных гемоглобинов — HbA_{1c} — в течение 2—3 нед увеличивается в 2—3 раза. Степень гликози-

лирования разных белков неодинакова; в основном она зависит от скорости обновления данного белка. В медленно обменивающихся белках накапливается больше модифицированных аминокрупп. Кроме того, в таких белках происходят дальнейшие изменения углеводных остатков: перестройка структуры, окислительные превращения, в результате которых образуются разнообразные «поздние продукты гликозилирования» (ППГ), часто коричневого цвета, флюоресцирующие и некоторые из них обладают высокой реакционной активностью и способностью дополнительно повреждать белки, в том числе образовывать поперечные сшивки между молекулами белков. К медленно обменивающимся белкам относятся многие белки соединительнотканых образований, межклеточного матрикса, базальных мембран. К тому же белки этих структур непосредственно контактируют с межклеточной жидкостью, в которой концентрация глюкозы такая же, как в крови (в клетках она обычно гораздо ниже в результате использования глюкозы в метаболических процессах). В этих структурах ППГ накапливаются с возрастом, накопление сильно ускоряется при сахарном диабете.

ППГ-белки могут гидролизываться макрофагами (с участием ППГ-рецепторов) или межклеточными протеолитическими системами с образованием ППГ-пептидов, часто длиной около 30 аминокислотных остатков. ППГ-белки, особенно образующиеся в результате их гидролиза ППГ-пептиды, попадают и в кровоток. Концентрация ППГ-пептидов в крови резко повышается при почечной недостаточности разного происхождения, в том числе при диабетической нефропатии. Это связано с тем, что элиминация ППГ-пептидов происходит с участием почек: ППГ-пептиды фильтруются в клубочках, реабсорбируются клетками проксимальных канальцев и катаболизируются в лизосомах этих клеток.

В экспериментах на крысах показано, что введение ППГ-белков в кровь приводит к ковалентному связыванию этих белков с белками межклеточного матрикса во многих тканях и к появлению структурных и функциональных нарушений, сходных с теми, которые бывают при сахарном диабете.

ППГ проявляют многообразную биологическую активность: повышают проницаемость эндотелиальных клеток, соединяются с рецепторами макрофагов, эндотелиальных и мезангиальных клеток, активируют макрофаги к секреции цитокинов (рецепторным путем), подавляют образование NO и соответственно ингибируют расширение сосудов, усиливают окисление ЛНП. В крови больных диабетом обнаруживаются антитела к ППГ-пептидам.



Рис. 7.17. Базальные мембраны органов (I) и капилляров почечного клубочка (II).

а — просвет капилляра; б — полость боуеновой капсулы; 1 — эндотелий; 2, 3, 4 — базальная мембрана клубочка: 2 — lamina rara interna, 3 — lamina densa, 4 — lamina rara externa; 5 — подоцит, отростками контактирующий с базальной мембраной.

7.9. ДИАБЕТИЧЕСКИЕ АНГИОПАТИИ

Первичные проявления ангиопатии обусловлены повреждением базальных мембран сосудов. Базальные мембраны (БМ) представляют собой пленки, на которых «растут» все клетки организма, кроме клеток соединительной ткани и крови: по одну сторону располагается клетка или слой клеток, а другой стороной БМ контактирует с фиброретикулярным межклеточным матриксом (рис. 7.17). Эндотелий кровеносных сосудов, в том числе капилляров, тоже располагается на базальных мембранах. В отличие от всех прочих органов в капиллярах почечного клубочка БМ трехслойная, а клетки располагаются по обе ее стороны.

В построении БМ участвуют коллагены, протеогликаны, неколлагеновые гликопротеины. Все компоненты БМ синтезируются прилегающими к ним клетками. Специальные функции выполняют интегрины — белки плазматической мембраны клеток, соединяющие клетку с БМ.

Коллаген IV типа — основной структурный белок базальных мембран. В геноме человека 6 локусов, кодирующих шесть

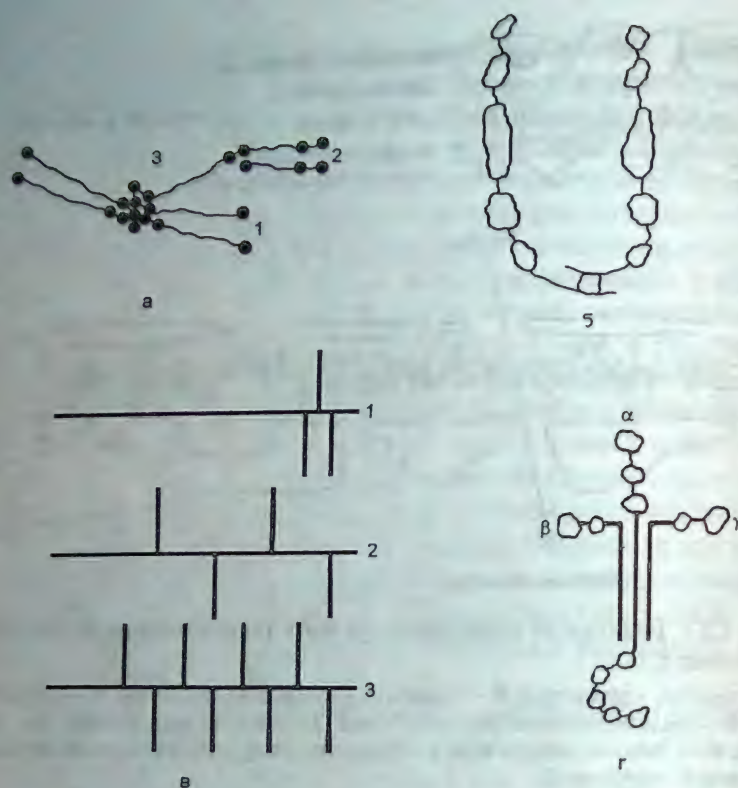


Рис. 7.18. Молекулы базальных мембран.

а — многомoleкулярные структуры, образуемые коллагеном IV типа: 1 — тетрамер; 2 — димер; 3 — мономер; б — фибронектин; в — основные гепарансульфат-протеогликаны БМК: 1 — перлекан; 2 — ГСПГ с мол. массой 200 000; 3 — ГСПГ с мол. массой 350 000 (горизонтальные линии — пептидные цепи, вертикальные линии — гепарансульфатные цепи); г — ламинин.

различающихся пептидных цепей, из которых строятся трехцепочечные молекулы коллагена IV типа. Чаще всего коллаген IV типа содержит цепи $\alpha 1(IV)$ и $\alpha 2(IV)$ в составе гетеротримеров $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$. Он относится к сетеобразующим коллагенам. Взаимодействуя С-концевыми глобулярными доменами, молекулы образуют димеры, а при взаимодействии N-концевыми глобулярными доменами — тетрамеры (рис. 7.18). Наряду с этими взаимодействиями конец в конец возможны и латеральные взаимодействия трехцепочечных спиральных доменов, в том числе с образованием суперспиралей. В результате этих взаимодействий образуется сетевидная трехмерная структура с гексагональными ячейками размером 170 нм. Коллаген IV типа имеет также центры связывания с некоторыми белками клеточной мембраны, в том числе с интегринами.

Значительную часть массы БМ составляют протеогликаны.

Эти молекулы содержат белковое ядро и ковалентно связанные с ним гликозаминогликаны. В БМ больше всего гепарансульфатпротеогликанов (ГСПГ) и значительно меньше хондроитинсульфатпротеогликанов.

Гепарансульфат представляет собой неразветвленную цепь, построенную из глюкуроновой кислоты и глюкозамина, с последовательностью (ГлкА — ГлкN)_n. Остаток глюкозамина может быть сульфирован по 2-й, 3-й и 6-й позициям. Молекулярная масса цепей обычно от 50 000 до 100 000. С одним белковым ядром ГСПГ обычно связано несколько цепей гепарансульфата. ГСПГ в БМ соединяется с коллагеном IV типа и ламинином определенными центрами белкового ядра и цепей гепарансульфата. Кроме того, ГСПГ разными способами может быть связан с поверхностью клеток: посредством как гликозаминогликановой части, так и белкового ядра.

Ламинин — специфичный для БМ неколлагеновый гликопротеин. Молекула ламинина — тример $\alpha\beta\gamma$, крестообразный, с тремя короткими ветвями и одной длинной (см. рис. 7.18, г).

Известны три разные цепи α , три цепи β и две цепи γ . Варианты цепей могут комбинироваться по-разному при образовании тримерной молекулы. Пока обнаружено семь разных ламининов. Каждая из ветвей содержит глобулярные домены, которые имеют ряд центров связывания разных лигандов. Короткие ветви участвуют в образовании БМ путем взаимодействия с другими молекулами ламинина, с коллагеном IV типа (при участии еще одного белка — нидогена), а также с интегрином $\alpha\beta_1$ клеточной мембраны. Глобулярный домен длинной ветви участвует в межклеточной адгезии, взаимодействуя с разными интегринными и другими белками плазматической мембраны клеток. Длинная ветвь взаимодействует также с гепарансульфатными протеогликанми.

Интегрины представляют собой трансмембранные гликопротеины, $\alpha\beta$ -димеры. Каждая цепь пересекает мембрану один раз. Обе цепи имеют большие внеклеточные домены (аминоконцевые), образующие центр связывания, комплементарный соответствующему лиганду — компоненту матрикса. Внутриклеточный домен взаимодействует с актиновым цитоскелетом посредством ряда промежуточных белков. С местом взаимодействия интегринов с цитоскелетом соседствуют сигнальные белки, которые активируются, когда к внеклеточному домену интегрин присоединяется лиганд. Таким лигандом могут быть ламинины, коллаген IV типа, протеогликаны.

Сила, с которой интегрин связывается с лигандом, может быстро и с высокой точностью регулироваться — свойство, которое называют «модуляция сродства». В покое (неактивном) состоянии интегрины имеют низкое сродство к

своим лигандам. Определенные стимулы превращают их в активные рецепторы с высоким сродством к лигандам. Это позволяет быстро приспособлять адгезивные свойства клеток к изменившимся условиям без изменения количества молекул адгезии. Сигнал, полученный интегрином, передается в клетку, поэтому могут изменяться не только адгезивные свойства клетки, но и внутриклеточные процессы.

Благодаря таким свойствам интегрины оказываются участниками многих фундаментальных физиологических и патофизиологических процессов, включая эмбриогенез, морфогенез, заживление ран, воспаление, миграцию опухолевых клеток, миграцию лейкоцитов.

Таким образом, молекулы БМ содержат специфические центры связывания с другими молекулами БМ и с клеточными мембранами. Это обеспечивает высокоупорядоченное позиционирование молекул в БМ. Интегрины служат не только для механической связи клетки с БМ, но также для передачи регуляторных сигналов, причем в двух направлениях: из БМ в клетку и из клетки в БМ.

Фиброретикулярный межклеточный матрикс (стромальный матрикс), с которым контактируют БМ (за исключением БМ почечных клубочков), в общих чертах сходен с БМ, но отличается от них по набору молекул и имеет менее упорядоченную структуру. В частности, в стромальном матриксе преобладают фибриллообразующие коллагены, в основном коллаген I типа, а также коллагены типов II, III, V и XI. Ламинины, характерные для БМ, отсутствуют в стромальном матриксе; вместо них здесь содержатся фибронектины.

В геноме человека один ген пептидной цепи фибронектина, но в результате альтернативного сплайсинга, а также посттрансляционной модификации (гликозилирование, фосфорилирование, сульфирование) образуется несколько форм белка. Фибронектин представляет собой димер двух одинаковых или немного различающихся субъединиц, соединенных антипараллельно двумя дисульфидными связями в области С-концов (см. рис. 7.18). Пептидная цепь образует несколько глобулярных доменов. Молекула фибронектина содержит специфические центры связывания с другими молекулами фибронектина, с коллагеном, гепарансульфатами, интегринными. Фибронектины синтезируются и секретируются многими клетками, включая фибробласты, гладкомышечные, эндотелиальные и эпителиальные клетки.

Нарушение высокоупорядоченной полимолекулярной структуры БМ (например, вследствие гликирования белков) изменяет связи между молекулами БМ и внеклеточным домением интегринов. Сигнал о повреждении с помощью интегри-

нов передается в клетки, которые реагируют изменением ряда функциональных свойств, в том числе начинают синтезировать трансформирующий фактор роста цитокин, стимулирующий синтез и подавляющий деградацию компонентов межклеточного матрикса.

Трансформирующий фактор роста (ТФР-β) — белок с мол. массой 12 500, гомодимер с дисульфидными связями между пептидными цепями. Он синтезируется большинством, если не всеми, клетками организма. Рецепторы ТФР-β — это трансмембранные Сер/Тре-киназы. ТФР-β по аутокринному и паракринному механизмам активизирует синтез компонентов матрикса: у коллагенов, фибронектина, ламинина, протеогликанов, а также пролиферацию и дифференцировку клеток многих типов. Он также снижает синтез протеаз и увеличивает содержание ингибиторов протеаз, в результате чего подавляется деградация компонентов межклеточного матрикса. Кроме того, ТФР-β стимулирует экспрессию интегринов и тем самым способствует образованию макроструктур БМ. Таким путем обеспечивается рост БМ и фиброретикулярного межклеточного матрикса, необходимый для пролиферации клеток в норме, а также для репарации поврежденных тканей.

Примером репарации повреждений может служить заживление кожной раны. В месте повреждения происходит агрегация тромбоцитов, из гранул которых освобождаются ТФР-β, а также тромбоцитарный фактор роста. Оба эти цитокина по паракринному механизму индуцируют секрецию ТФР-β клетками в области повреждения, и таким путем инициируется процесс репарации повреждения. ТФР-β служит аттрактантом для фибробластов и индуцирует синтез коллагенов и других компонентов матрикса в привлеченных фибробластах и в клетках, контактирующих с БМ. Во взаимодействии с ТФР-β в репарации повреждения участвуют и другие цитокины. Тромбоцитарный фактор роста, а также фактор некроза опухолей и интерлейкин-1 индуцируют пролиферацию и миграцию клеток по мере образования матрикса. Фактор роста фибробластов индуцирует образование новых сосудов.

Как отмечалось, тромбоцитарный фактор роста стимулирует экспрессию ТФР-β. С другой стороны, ТФР-β блокирует действие тромбоцитарного фактора, подавляя экспрессию его рецепторов. Возможно, такое взаимодействие имеет значение для замедления и выключения процесса на завершающих стадиях репарации.

При сахарном диабете в условиях непрерывного действия патогенного фактора (высокая концентрация глюкозы и гликирование белков) происходит дефектное ремоделирование БМ, главным образом, вероятно, вследствие постоянной сек-

реции ТФР- β : нарушается баланс между синтезом и распадом компонентов БМ в сторону усиления синтеза, нарушаются нормальные пропорции в содержании компонентов БМ и его структурная организация. Утолщение БМ капилляров — один из самых ранних и постоянных признаков сахарного диабета. В области фиброретикулярного межклеточного матрикса диабетические повреждения также способствуют накоплению компонентов матрикса в результате активации фибробластов, синтезирующих коллагены и другие компоненты матрикса. При этом клетки пораженного органа замещаются рубцовой соединительной тканью (другие термины для описания такого процесса: фиброз, склероз).

Для разных органов характерны специфические особенности молекулярного состава и структуры межклеточного матрикса, что обуславливает различные клеточный состав и функции. Вследствие этого диабетические повреждения матрикса, одинаковые в своей молекулярной основе в начальных стадиях, развиваются в каждом органе особым путем.

Макроангиопатии. Поражения крупных и средних сосудов сердца, мозга, нижних конечностей обычно имеют форму атеросклероза и развиваются в гораздо более раннем возрасте, чем у лиц, не страдающих диабетом. Смертность от сердечно-сосудистых заболеваний при диабете примерно втрое выше.

Большинство патологических изменений происходит во внутренней оболочке артерий. Повреждение в результате гликирования может начинаться с БМ: цитокиновые сигналы изменяют реактивность клеток (эндотелиальных, гладкомышечных, макрофагов), в результате чего начинаются поглощение липопротеинов и образование бляшки. Этому способствует хронически повышенное содержание ЛОНП (атерогенные липопротеины) в крови больных диабетом.

Возможен другой механизм повреждения артериальной стенки при сахарном диабете — гликирование белков, в частности коллагена и эластина, в среднем и наружном слоях. Механические свойства упорядоченных сетевых структур, построенных из коллагена и эластина, имеют решающее значение для функционирования артерий и точно соответствуют гемодинамическим условиям в кровотоке каждого участка артериального русла.

Коллаген и эластин — очень медленно обменивающиеся белки, и поэтому велика вероятность накопления в них повреждений, связанных с гликированием. После инкубации в течение нескольких дней отрезков артерий в растворе глюкозы в них обнаруживаются ППГ-белки, в том числе коллаген и эластин, снижаются прочность и растяжимость артериальной стенки. Недавно выявлен ППГ, обозначенный как NFC-1 (его

строение пока неизвестно). NFC-1 с высокой активностью образует поперечные сшивки между молекулами коллагена. В аорте больных сахарным диабетом количество поперечных сшивок, образованных NFC-1, увеличивается с возрастом и достигает величин до одной сшивки на одну молекулу коллагена. Это, конечно, может существенно изменить физические свойства сосуда. Не исключаются нарушения, связанные с изменением скорости синтеза и деградации компонентов матрикса. Например, относительное количество гепарансульфата в средней оболочке коронарных артерий у больных сахарным диабетом снижено почти вдвое по сравнению с нормой.

Микроангиопатии. Нефропатия — одна из основных форм диабетических микроангиопатий. Она встречается примерно у трети больных ИЗСД. Для завершающих стадий диабетической нефропатии характерны гломерулосклероз и нефросклероз, приводящие к хронической почечной недостаточности и смерти больных от уремии. Клинические признаки нефропатии появляются через 10—15 лет после манифестации диабета, и еще в течение нескольких лет болезнь развивается до появления симптомов уремии. Диабетическая нефропатия — одна из главных причин инвалидизации и смерти больных сахарным диабетом.

Основу капиллярной стенки в клубочках составляет базальная мембрана клубочков (БМК). На внутренней поверхности БМК располагаются эндотелиальные клетки, на внешней — подоциты (см. рис. 7.17). Фильтрация плазмы происходит через фенестры («окна») — промежутки между эндотелиальными клетками на внутренней поверхности капилляра и между отростками подоцитов — на наружной поверхности. Между капиллярами находится мезангий, имеющий древовидную форму и поддерживающий капилляры. Мезангий содержит мезангиальные клетки и мезангиальный матрикс. Мезангиальные и эпителиальные клетки синтезируют и секретируют компоненты мезангиального матрикса и БМК.

Основные функции почечного клубочка — обеспечить достаточную скорость фильтрации плазмы и в то же время жестко ограничить прохождение альбумина и других белков плазмы. Эти функции определяются свойствами БМК. От плотности укладки молекул коллагена IV типа и протеогликанов зависит избирательность фильтрации по размеру фильтрующихся молекул. Гепарансульфатные цепи ГСПГ содержат много сульфатных групп, ионизированных при физиологических значениях pH. Отрицательный заряд этих молекул при фильтрации плазмы крови обеспечивает избирательную проницаемость БМК для белков в зависимости от их заряда. Альбумин человека, имеющий мол. массу 66 000 (эллипсоид размером

3,8·15 нм) и отрицательный заряд (–18 при pH 7,4), в норме лишь в небольших количествах пересекает БМК и попадает в первичную мочу. Профильтровавшийся альбумин затем эндотелируется тубулярными клетками. Альбуминурия является следствием главным образом нарушения проницаемости БМК, но определенное значение может иметь нарушение функции тубулярных клеток.

Базальные мембраны почечных клубочков — очень интенсивно функционирующая структура: у человека за сутки через них фильтруется 180 л плазмы крови, т.е. вся жидкость организма четырежды проходит через БМК. БМ выступает главным функциональным элементом клубочка. Канальцы нефрона — тоже интенсивно функционирующие структуры, только поток воды и растворенных в ней веществ идет в обратном направлении — из первичной мочи в кровь, причем ряд веществ реабсорбируется против градиента концентрации. Масса канальцевой зоны значительно больше массы клубочков. БМК в большей мере подвержена риску повреждения, чем другие органы, поскольку вместе с плазмой через нее идет массивный поток токсичных веществ, включая ППГ. Вероятно, гомеостаз БМК в норме поддерживается соответствующей скоростью репарации повреждений. К сожалению, нет достаточных сведений о скорости обновления белков БМК.

Считают, что при диабете повышенная в течение многих лет концентрация ППГ приводит к утолщению стенки кровеносных сосудов, экспансии мезангиального матрикса, утолщению БМ. По результатам исследований гломерулярных клеток в культуре и клубочков от крыс со streptozotocin-диабетом, можно заключить, что при диабете индуцируется экспрессия мРНК коллагенов I, III, IV и VI типов, фибронектина, ламинина и снижается синтез мРНК гепарансульфатных протеогликанов. Уменьшение содержания гепарансульфатов относительно других компонентов ведет к нарушению структурной организации БМК и увеличению ее проницаемости для белков.

При инкубации мезангиальных клеток крысы с экзогенным ППГ активируется экспрессия мРНК коллагена IV типа ламинина, гепарансульфата. Если здоровым мышам ввести ППГ-альбумин (мышинный), то увеличивается содержание компонентов межклеточного матрикса и активируется экспрессия мРНК ТФР-β. Мышам линии db/db с диабетом и повышенным содержанием гликированного альбумина в крови вводили мышинные моноклональные антитела, специфичные к мышинному гликированному альбумину. Через 4 нед наблюдали заметное снижение протеинурии, экспансии мезангиального матрикса и экспрессии мРНК коллагена IV типа и фибронектина. Таким образом, циркулирующий ППГ-альбумин

постоянно повреждает клубочки, которые отвечают на это гиперпродукцией межклеточного матрикса, опосредованной ТФР-β.

Накопление белков межклеточного матрикса и изменение их состава в гломерулярной, тубулярной и интерстициальной областях почки, утолщение БМК, гипертрофия и, в меньшей степени, ускоренная пролиферация мезангиальных клеток — основные патоморфологические изменения при диабетической нефропатии. При усиленном образовании межклеточного матрикса происходят прогрессивное утолщение стенки сосудов, снижение скорости клубочковой фильтрации, нарушение проницаемости БМ (и как следствие — альбуминурия). Следствием всех этих изменений являются полное закрытие сосудов и образование рубца на месте клубочка (гломерулосклероз). Сходные изменения происходят и в тубулярной области (тубулоинтерстициальный фиброз). Эти процессы характеризуют финальные стадии развития нефропатии.

Указанные изменения рассматриваются как результат нарушения репаративных процессов, направленных на устранение повреждений БМК и мезангия матрикса, вызванных гипергликемией и другими факторами, действующими при сахарном диабете. Важнейшим звеном нарушения является гиперпродукция ТФР-β.

У крыс со streptozotocin-диабетом на 24–40-й неделе ТФР-β обнаруживается в мезангии и стенках клубочковых капилляров (используют иммуногистохимический метод), причем его нарастание коррелирует с альбуминурией и накоплением коллагена I типа. Инкубация мезангиальных клеток или клубочков *in vitro* в среде с высокой концентрацией глюкозы резко увеличивает в них синтез ТФР-β. Причинами накопления ТФР-β может быть повышенная секреция резидентными клетками или дегрануляция тромбоцитов. В ряде работ отмечено увеличение содержания мРНК и белка ТФР-β в клубочках при экспериментальном диабете, а также при диабете у человека. Экспрессия мРНК ТФР-β в клубочках диабетических крыс через 12–15 нед повышается в 2–3 раза по сравнению с контрольными крысами. В этих условиях лечение крыс инсулином снижает экспрессию мРНК ТФР-β.

При остром гломерулонефрите увеличение экспрессии ТФР-β и продукции матрикса бывает преходящим. Прогрессирующее накопление матрикса и развитие фиброза требует повышенной секреции ТФР-β в течение длительного времени, что наблюдается при диабетической нефропатии у человека и в экспериментальных моделях диабетической нефропатии.

Диабетическая нефропатия развивается только у третьих больных сахарным диабетом. Это указывает на то, что, кро-

ме гипергликоземии, имеют значение и другие факторы, связанные с индивидуальными генетическими особенностями.

Диабетическая ретинопатия на ранних стадиях проявляется микроаневризмами сосудов, точечными кровоизлияниями в сетчатку, расширением сосудов сетчатки, отеком (непролиферативная фаза), затем происходит новообразование сосудов в сетчатке и стекловидном теле (пролиферативная фаза). С течением времени эти изменения становятся все более выраженными. Причинами слепоты являются кровоизлияния из вновь образованных сосудов в сетчатку или в стекловидное тело и отслойка сетчатки.

Прогрессирование диабетической нефропатии в большей мере зависит от продолжительности заболевания и эффективности контроля гликемии.

7.10. ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Диагностика. Диагноз сахарного диабета часто можно поставить уже на основе жалоб больного на полиурию, полидипсию, полифагию, ощущение сухости во рту. Однако нередко необходимы специальные исследования, в том числе лабораторные.

Толерантность к глюкозе определяют, если концентрация глюкозы в плазме венозной крови в пределах нормы, т.е. не превышает 6,4 ммоль/л (у детей 7,2 ммоль/л). Концентрация глюкозы более 7,8 ммоль/л свидетельствует о сахарном диабете и тогда нет необходимости проводить тест толерантности к глюкозе.

Гликозилированные гемоглобины содержатся в крови человека. Обычно определяют уровень HbA_{1c}, которого в норме около 5 % от всего содержания гемоглобина. При диабете концентрация HbA_{1c} увеличивается в 2—3 раза. Содержание HbA_{1c} определяют не только для диагностики, но и для контроля эффективности компенсации гликемии при инсулинотерапии. Это возможно потому, что концентрация гликозилированного гемоглобина пропорциональна усредненной концентрации глюкозы в крови за последние несколько недель.

Инсулин и С-пептид секретируются β-клетками в эквивалентных количествах. В печени задерживается около 60 % инсулина, поступающего с кровью воротной вены из поджелудочной железы, поэтому отношение концентрации С-пептида/инсулина в воротной вене и периферическом кровообращении при обычных условиях равно примерно 3/1 (или больше, поскольку из периферической крови инсулин удаляется с боль-

шей скоростью, чем С-пептид). С-пептид удаляется из организма в основном через почки. Суточная экскреция С-пептида составляет около 45 мкг и пропорциональна суточной продукции инсулина. Таким образом, по величине суточной экскреции С-пептида можно судить о функциональном состоянии β-клеток.

Альбуминурия — один из ранних признаков сахарного диабета. В норме за сутки с мочой выводится в среднем 8 мг альбумина. Состояние, когда суточное выведение альбумина достигает 30—300 мг, называют микроальбуминурией, при этом концентрация альбумина в моче равна 20—200 мг/л. При ИЗСД микроальбуминурия редко бывает в первые 5—10 лет после постановки диагноза диабета, а появившись, непрерывно увеличивается на 15—40 % в год. Микроальбуминурия является предвестником диабетической нефропатии, которая развивается через 6—12 лет после установления микроальбуминурии.

Лечение. Основные традиционные методы лечения ИЗСД — это диетотерапия, инсулинотерапия, а также специфические методы лечения при осложнениях.

К диете при лечении диабета предъявляются строгие требования: 4—5-кратный прием пищи в течение суток, исключение легкоусвояемых («быстрых») углеводов, полное исключение сахара, пива, спиртных напитков, сиропов, соков, сладких вин, пирожных, печенья, бананов, винограда и подобных им продуктов. Иногда соблюдение диеты можно использовать как единственный метод лечения. Гораздо чаще приходится прибегать и к другим методам, прежде всего к инсулинотерапии. Инсулинотерапия остается основным методом лечения. Цель ее — поддержание нормогликемии или, иначе, компенсация нарушений складирования энергоносителей, в основном гликогена и жиров. Инсулин вводят с интервалами, которые определяются числом приемов пищи и ее составом, а также чувствительностью пациента к биологическому действию инсулина. Обычно требуется одна или две инъекции в день; три или больше инъекций в день лучше защищают от развития поздних осложнений.

Наиболее широко и эффективно для лечения больных ИНСД применяются сахароснижающие препараты. Они представляют собой производные сульфонилмочевины или бигуаниды. Механизм действия этих лекарственных средств, найденных эмпирически, до сих пор остается не вполне ясным. Общим для них является то, что они снижают концентрацию глюкозы в крови.

7.11. ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ

Инсулинотерапией не удается достигнуть той степени точности регуляции гликемии, которая обеспечивается нормальными панкреатическими островками. Часты эпизоды гипергликемии, а отсюда — гликирование белков и поздние осложнения сахарного диабета. Гипергликемия в течение нескольких дней вызывает изменения в капиллярах. Первоначальные изменения могут быть обратимыми, но повторяющиеся эпизоды гипергликемии приводят к необратимым повреждениям. В связи с этим все еще актуальны поиски новых методов лечения больных диабетом.

Трансплантация панкреатических островков или β -клеток. Продолжаются попытки лечения больных ИЗСД трансплантацией поджелудочной железы, панкреатических островков (островков Лангерганса), β -клеток. Однако трансплантация часто не удается (отторжение трансплантата), а если удастся, то в дальнейшем необходимо постоянное применение иммунодепрессантов. Однако экспериментальные исследования в этом направлении продолжают и позволяют надеяться на успех. В частности, выживанию аллогенного трансплантата островков Лангерганса способствует котрансплантация сингенных миобластов, модифицированных так, что они экспрессируют лиганд Fas. Когда лиганд взаимодействует с его рецептором на иммунной клетке, индуцируется апоптоз этой клетки. У мышей со стрептозотоциновым диабетом выживаемость островков, покрытых такими миобластами и введенных под капсулу почки, увеличилась с 10 до 84 дней, как полагают, вследствие уничтожения Т-лимфоцитов прежде, чем они достигнут β -клеток.

Исследуется и другой способ защиты трансплантируемых островков от действия иммунных лимфоцитов и иммуноглобулинов: трансплантат заключают в полупроницаемую мембрану, пропускающую лишь малые молекулы, в частности инсулин.

Трансплантация генетически реконструированных клеток. Перспективным направлением поиска новых средств лечения диабета является создание методами генной инженерии клеток, не вызывающих иммунного ответа и в то же время способных секретировать инсулин пропорционально концентрации глюкозы в крови. Исходным материалом для таких конструкций могут быть клетки самого пациента; таким путем снимаются проблемы, связанные с отторжением трансплантата.

Клетка, пригодная для трансплантации, должна обладать рядом специфических свойств:

- 1) содержать глюкозоизмерительный аппарат, т.е. ГЛЮТ-2 и глюкокиназу;
- 2) экспрессия высокоаффинных тексокиназ должна быть небольшой;
- 3) иметь эффективный механизм экспрессии проинсулина и образования инсулина;
- 4) иметь механизм регуляции секреции инсулина в ответ на изменения концентрации глюкозы.

Неизвестны клетки с таким набором свойств, кроме β -клеток, однако существующий арсенал методов генной инженерии допускает возможность создания подобных клеток. В частности, ведутся работы по модификации гепатоцитов в инсулинпродуцирующие клетки.

Стимуляция регенерации панкреатических островков как возможный метод лечения диабета. В поджелудочной железе человека содержится 10^4 — 10^6 островков Лангерганса, примерно 1,5 % от объема железы. Около 75 % клеток островков приходится на β -клетки, синтезирующие инсулин, примерно 20 % составляют α -клетки, синтезирующие глюкагон.

Островки при эмбриогенезе развиваются из эндодермальных клеток, находящихся в эпителиальном слое протоков поджелудочной железы. У взрослых пролиферативная активность островков весьма ограничена, и все же их количество может увеличиваться двумя путями: путем пролиферации уже существующих β -клеток и путем дифференцировки из клеток протоков. Дифференцировку и пролиферацию стимулируют некоторые факторы роста: пролактин, гормон роста, бетацеллюлин (белок семейства эпидермальных факторов роста), белок REG (лектин С-типа, экспрессируемый островками).

В поджелудочной железе плода крысы число инсулинсодержащих клеток, определяемых иммуноцитохимическим методом, увеличивается вдвое в течение двух дней непосредственно перед рождением. Скорость роста популяции всех островковых клеток, включая β -клетки, заметно снижается через 3—4 дня после рождения. После удаления поджелудочной железы (90 %) у молодых крыс происходит регенерация как экзокринной, так и эндокринной ткани.

В раннем периоде жизни количество β -клеток определяется балансом между репликацией существующих клеток и появлением новых в результате дифференцировки — с одной стороны и апоптоза — с другой. У новорожденных крыс преходящая волна апоптоза наблюдается в течение 1—2 нед после рождения. Общая масса β -клеток при этом существенно не изменяется, поэтому следует полагать, что потери, вызванные апоптозом, компенсируются новой популяцией клеток. Опи-

сан сходный эпизод апоптоза β -клеток в поджелудочной железе плода человека в III триместре. Возможно, апоптоз нужен для смены популяции β -клеток, приспособленных к условиям *in utero*, на β -клетки, функционирующие после рождения.

Диабетом заболевают лишь небольшая часть индивидов с аутоиммунностью к β -клеткам, определяемой по наличию антител к ним. Это указывает на то, что другие факторы могут играть решающую роль в развитии болезни. Гистологическими методами давно установлено, что у молодых пациентов с ИЗСД происходит регенерация островков, содержащих преимущественно β -клетки, наряду с продолжающимся аутоиммунным разрушением β -клеток. Поджелудочная железа взрослых утрачивает способность к регенерации островков. Общее количество β -клеток, а следовательно, и клинические проявления диабета зависят, с одной стороны, от баланса между деструктивным аутоиммунным процессом и способностью поджелудочной железы увеличивать массу β -клеток — с другой. Стрептозотацин (N-[метилнитрозокарбамоил]-D-глюкозамин) у новорожденных крыс вызывает интенсивное разрушение β -клеток и диабет, однако уже на 14-й день у них наступает нормогликемия. При этом наблюдается значительная митотическая активность в области эпителия протоков, где образуются предшественники β -клеток.

Частичная перевязка протока поджелудочной железы у золотистого хомячка стимулирует дифференцировку эндокринных клеток и образование островков. Экстракт поджелудочной железы этих хомячков стимулирует регенерацию островков у хомячков со стрептозотациновым диабетом (при внутривентрикулярном введении), нормализует концентрацию глюкозы в крови и увеличивает выживаемость диабетических хомячков. Исследования подобного рода направлены на выяснение молекулярных механизмов регуляции пролиферации и дифференцировки β -клеток, которые в свою очередь могут послужить основой для разработки методов лечения больных ИЗСД.

Неудовлетворительные результаты лечения ИЗСД иммуномодуляторами, возможно, объясняются именно недостаточной пролиферативной активностью β -клеток. Недавно было найдено, что одновременное подавление иммунного процесса и стимуляция пролиферации β -клеток оказывается более эффективным при лечении диабета у мышей линии NOD. В качестве иммуномодулятора применяли линомид (хинолин-3-карбоксамид), а в качестве стимулятора пролиферации β -клеток — белок Reg, экспрессирующийся в панкреатической ацинарной ткани. Каждый из этих агентов по отдельности ослабляет проявления сахарного диабета на ранних стадиях развития болез-

ни, в то время как на более поздних стадиях такой же эффект достигается лишь при одновременном применении линомида и белка Reg. При этом отмечено увеличение количества островков в поджелудочной железе, β -клеток в островках и содержания инсулина в железе. Возможно, эти данные указывают путь к разработке эффективных методов лечения ИЗСД.

7.12. ПРЕДСКАЗАНИЕ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА

В настоящее время ИЗСД рассматривается как многофакторное заболевание, обусловленное и наследственной предрасположенностью, и влияниями среды обитания. В западных странах примерно один из 300 индивидов случайной выборки заболевает ИЗСД, а среди родственников первой степени родства больных ИЗСД заболевает один из 20 индивидов. Если один из монозиготных близнецов болен ИЗСД, то риск заболевания другого близнеца оценивается в 30—50 % в течение 6 лет (по другим данным, до 90 %). Таким образом, предрасположенность к болезни имеет генетическую основу. В целом, по примерным оценкам, заболеваемость на 80 % определяется генотипом и на 20 % — факторами среды.

ИЗСД является полигенной болезнью; у мышей найдено более 10 генных локусов, определяющих предрасположенность. У человека восприимчивость к ИЗСД в наибольшей мере зависит от генов ГКГ и особенно от полиморфизма HLA-генов, кодирующих белки класса II (гены DP, DQ и DR в коротком плече хромосомы 6). Гены HLA являются наиболее полиморфной генетической системой популяций человека. С нарушением функций этой системы связаны многие аутоиммунные заболевания, в том числе ИЗСД.

Область генов ГКГ класса II

Группы генов	DP				DQ				DR			
ДНК	—	//	—	—	—	—	//	—	—	—	//	—
Гены	B2	A2	<u>B1</u>	<u>A1</u>	B2	A2	B3	<u>B1</u>	<u>A1</u>	<u>B*</u>	<u>A</u>	1
Число аллелей			32	8				35	19			

A — гены α -цепей, B — гены β -цепей белков ГКГ. Подчеркнуты действующие гены, остальные — псевдогены (не экспрессируются). Указанное число аллелей не окончательное; обнаруживаются все новые аллели.

В отличие от генов групп DP и DQ, каждый из которых представлен одним локусом (локус DPB2, локус DPA2 и т. д.),

в группе DR участок В* (DRB*) содержит 9 локусов (DRB 1—9), из которых 5 — псевдогены (не экспрессируются). Действующие гены 1, 3, 4 и 5 кодируют каждую особую β -цепь. Кроме того, эти гены полиморфны: например, известно около 200 аллелей гена DRB1.

Ген DRA — единственный и неpolиморфный, так что у всех индивидов все белки ГКГ, кодируемые областью DR, имеют одинаковую α -цепь: DR α ₁, DR α ₂, DR α ₃ и DR α ₄. Еще раз отметим, что гены В и соответственно β -цепи полиморфны. Например, может быть 200 разных белков DR α ₁, по числу аллелей гена DRB1.

Метод полимеразной цепной реакции позволяет быстро и точно определять наличие того или иного аллеля в геноме и проводить массовые исследования распределения аллелей среди индивидов популяции. Обнаружилось, что у больных ИЗСД встречаемость аллелей ГКГ класса II существенно отличается от встречаемости тех же аллелей у здоровых. Некоторые аллели ассоциированы с ИЗСД, т.е. часто встречаются у больных; очевидно, они и определяют предрасположенность к болезни. И наоборот, есть аллели, которые почти не встречаются у больных ИЗСД; их рассматривают как снижающие предрасположенность, протективные аллели. Интересно, что протективные аллели являются доминантными по отношению к предрасполагающим. Еще более четко связь между генотипом и ИЗСД проявляется, если учитывать распределение не отдельных генов, а комбинаций нескольких генов.

Предрасположенность к ИЗСД в зависимости от генотипа (число после звездочки — шифр аллеля)

Предрасполагающие генотипы

DRB1*0301, DQA1*0501, DQB1*0201
DRB1*0401, DQA1*0301, DQB1*0302.

Протективные генотипы

DRB1*1501, DQA1*0102; DQB1*0602
DRB1*0401, DQA1*0301, DQB1*0301.

Результаты исследований генома позволяют надеяться, что в будущем возможно с высокой вероятностью предсказывать, заболеет ли ИЗСД данный индивид. Однако предстоит еще очень большая работа по изучению влияния отдельных генов и их комбинаций на предрасположенность к ИЗСД. Исследования осложняются тем, что предрасполагающие и протективные генотипы неодинаковы у разных этнических групп. Давно известна неравномерность распространения ИЗСД в разных регионах мира. Например, в Японии больны 1,7 % населения, в России — около 5 %, в большинстве стран Европы и в

США — 5—12 %, в Скандинавских странах Европы — около 20 %, а в Финляндии — даже 35 % населения. Теперь выясняется, что такая неравномерность в значительной мере связана с особенностями распространения аллелей генов HLA в геноме разных этносов. Например, в Эндокринологическом научном центре РАМН выполнены исследования по распространенности аллелей локусов DR и DQ у больных ИЗСД и здоровых доноров трех этнических групп: европеоидной (русские), монголоидной (буряты) и смешанной евро-монголоидной (узбеки). Заболеваемость ИЗСД русских и узбеков составляет от 1,5 до 5 на 10 000, бурят — примерно в 10 раз ниже. Найдены генотипы предрасположенности к ИЗСД, как общие для всех трех групп, так и этноспецифические. К последним относятся следующие генотипы:

специфичные для русских:

DRB1*17/DQA1*0501; DRB1*17/DQB1*0201 и DQA1*0501/DQB1*0201;

специфичный для бурят:

DQA1*0201/DQB1*04;

специфичные для узбеков:

DRB1*17/DQA1*0501, DRB1*17/DQB1*0201 и DQA1*0501/DQB1*0201.

Таким образом, необходимо определять генотип каждой этнической группы, а нарастающее смешение этносов вносит дополнительные сложности. Тем не менее это направление исследований, безусловно, перспективно. Оно, в частности, может оказаться полезным для выяснения механизма развития аутоиммунной реакции, ведущей к гибели β -клеток; могут быть обнаружены молекулярные мишени для лекарственного воздействия на процесс. Возможность предсказания ИЗСД позволит применять методы генетической консультации для предупреждения рождения детей, предрасположенных к заболеванию ИЗСД. Наконец, эти исследования перемещают задачу предупреждения ИЗСД у детей, родившихся с предрасполагающим генотипом, в разряд актуальных и одновременно создают основу для решения этой задачи. В настоящее время клинически ИЗСД попадает в поле зрения врача при появлении клинических признаков, т.е. после того, как в течение нескольких лет в результате аутоиммунного процесса уже погибло около 80 % β -клеток. Если проводить обследование всех новорожденных на генетическую предрасположенность к ИЗСД, то детей с неблагоприятным генотипом можно взять под наблюдение и принимать предупредительные меры при угрозе начала аутоиммунного процесса.

Способы предупреждения диабета тоже еще только предстоит разработать. В экспериментах на животных такие ре-

зультаты уже получаются, причем довольно простыми методами. Например, у мышей линии NOD с высокой генетической предрасположенностью к диабету удается предотвратить болезнь диетой, не содержащей некоторых белков, инфицированием многими вирусами, однократным введением адъюванта Фрейнда или BCG, пептидов инсулина. В более отдаленной перспективе могут быть разработаны методы генной терапии.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ

1. Почему сахарный диабет считают важной медико-социальной проблемой?
2. Укажите различия в строении и функционировании внеклеточной и внутриклеточной частей рецептора инсулина.
3. Как изменяются свойства субстрата 1 рецептора инсулина в результате его фосфорилирования?
4. Какими могут быть последствия наследования дефектного субстрата 1 рецептора инсулина?
5. Каким образом инсулин активирует фосфатидилинозитол-3-киназу?
6. Каким образом стимулируемая инсулином через путь Ras протеинфосфатаза участвует в регуляции обмена гликогена?
7. Чем отличается трансмембранный перенос глюкозы в канальцах почек от переноса глюкозы из крови в адипоциты?
8. Чем отличается трансмембранный перенос глюкозы из клеток кишечника в кровь от переноса глюкозы из крови в мышечные клетки?
9. Чем отличается трансмембранный перенос глюкозы из крови в адипоциты от переноса глюкозы из крови в гепатоциты?
10. Укажите основные различия в метаболизме углеводов и жиров при пищеварении и в постабсорбтивном состоянии.
11. Как участвует глюкагон в переключении метаболизма при смене абсорбтивного и постабсорбтивного состояний?
12. Почему интерлейкин-1 токсичен для β -клеток?
13. Как изменяется метаболизм основных энергоносителей при дефиците инсулина?
14. Почему при диабете образуется много кетоновых тел?
15. Укажите основные причины и механизмы развития диабетической комы.
16. Как происходит гликирование белков и к каким последствиям это ведет?
17. Укажите основные формы диабетических ангиопатий.
18. Укажите достоинства и недостатки инсулинотерапии сахарного диабета.
19. Как образуется многообразие T-рецепторов в организме?
20. Как возникают различия между индивидами по белкам ГКП?
21. На чем основывается возможность предсказания заболевания сахарным диабетом?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев Л.П., Дедов И.И., Зилов А.В. и др. Межпопуляционный подход в установлении ассоциированной с HLA генетической предрасположенности к инсулинзависимому сахарному диабету//Сахарный диабет. — 1998. — № 1. — С. 19—21.
2. Дедов И.И. Сахарный диабет в Российской Федерации: проблемы и пути решения//Сахарный диабет. — 1998. — № 1. — С. 7—18.
3. Border W.A., Yamamoto T., Noble N.A. Transforming growth factor b in diabetic nephropathy. — Diabetes/Metabolism Reviews, 1996.
4. Cheatham B., Kahn C.R. Insulin action and insulin signaling network//Endocrine Rev. — 1995. — Vol. 16. — P. 17—142.
5. Dhanyantari S., Brubaker P.L. Proglucagon processing in an islet cell line: effect of PC1 overexpression and PC2 depletion//Endocrinology. — 1998. — Vol. 139. — P. 1630—1637.
6. Eizirik D.L., Flodstrom M. et al. The harmony of the spheres: Inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells//Diabetologia. — 1996. — Vol. 39. — P. 875—890.
7. Gross D.J., Weiss L., Reibstein J. et al. Amelioration of diabetes in non obese diabetic mice with advanced disease by linomide-induced immunoregulation combined with Reg protein treatment//Endocrinology. — 1998. — Vol. 139, N 5. — P. 2369—2374.
8. Ling Z., Meng-Chi Chen, Smisman A. et al. Intercellular differences in interleukin-1b-induced suppression of insulin synthesis and stimulation of noninsulin protein synthesis by rat pancreatic b-cells//Endocrinology. — 1998. — Vol. 139, N 4. — P. 1540—1545.
9. Mandrup-Poulsen. The role of interleukin-1 in pathogenesis of IDDM//Diabetologia. — 1996. — Vol. 39. — P. 1005—1029.
10. Mitanches D., Doiron B., Chen R., Kahn A. Glucose-stimulated genes and prospects of gene therapy for type I diabetes//Endocrine reviews. — 1997. — Vol. 18, N 4. — P. 520—540.
11. Prentki M. New insight into pancreatic b-cell metabolic signaling in insulin secretion//Europ. J. Endocrinol. — 1996. — Vol. 134. — P. 272—286.
12. Rosenberg L., Vinic A.I., Pittenger G.L. Islet cell regeneration in the diabetic hamster pancreas with restoration of normoglycaemia can be induced by a local growth factor(s)//Diabetologia. — 1996. — Vol. 39. — P. 256—262.
13. Scarim A.L., Heitmeier M.R., Corbett J. Irreversible inhibition of metabolic function and islet destruction after a 36-hour exposure to interleukin-1b//Endocrinology. — 1997. — Vol. 138. — P. 5301—5307.
14. Schuit F., De Vost A., Farfari S. et al. Metabolic fate of glucose in purified islet cells//J. Biol. Chem. — 1997. — Vol. 272. — P. 18 572—18 579.
15. Sims T.J., Rasmussen L.M., Oxlund H., Bailey A.J. The role of glycation cross-links in diabetic vascular stiffening//Diabetologia. — 1996. — Vol. 39. — P. 946—951.

16. Varlamov O., Fricker L.D. et al. b-Cells lines derived from transgenic Cpefat/Cpefat mice are defective in carboxypeptidase E and proinsulin processing//Endocrinology. — 1997. — Vol. 138, N 11. — P. 4883—4892.

17. Zierath J.R., Handberg A., Tally M., Wallberg-Henriksson H. C-peptide stimulates glucose transport in isolated human skeletal muscle independent of insulin receptor and tyrosine kinase activation//Diabetologia. — 1996. — Vol. 39. — P. 306—313.

Глава 8

АЛКОГОЛИЗМ

Проблема алкоголизма на протяжении многих веков была, остается и, видимо, еще долго будет актуальной для человечества в социальном, медицинском плане и даже в аспекте сохранения здорового генофонда людей. Отсюда понятен интерес к этой проблеме специалистов разных профилей, в том числе биохимиков. Выяснение механизмов острого и хронического действия алкоголя на организм человека, взаимосвязи метаболизма эндогенного и экзогенного этанола, его влияния на структуры и обмен веществ — все это в совокупности с данными, получаемыми патофизиологами, фармакологами и клиницистами, должно позволить практической медицине решать вопросы диагностики, профилактики и лечения алкогольной болезни.

Молекула этилового спирта имеет небольшие размеры (радиус около 0,43 нм) и обладает амфифильностью. Поэтому этанол растворяется хорошо как в воде, так и в липидах, что обеспечивает ему быстрое распространение по организму и мембранотропное действие.

В организме человека постоянно имеется этанол, концентрация которого в крови колеблется от 0,0004 до 0,001 г/л и даже до 0,01 г/л в зависимости от индивидуальных особенностей метаболизма. У животных с пониженным содержанием эндогенного этанола повышена скорость его метаболизма и выведения; в соответствии с этим отмечается влечение к этанолу. По-видимому, и у человека потребность в экзогенном этаноле может быть отчасти объяснена снижением концентрации эндогенного этанола при старении, голодании, авитаминозах, стрессах.

Порог чувствительности человека к экзогенному этанолу соответствует его концентрации в крови порядка 0,1 г/л (табл. 8.1).

8.1. НАЧАЛЬНЫЕ СТАДИИ МЕТАБОЛИЗМА ЭНДОГЕННОГО ЭТАНОЛА В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

Источник эндогенного этанола — эндогенный ацетальдегид (Ац), который образуется главным образом в результате декарбоксилирования пирувата (рис. 8.1) при участии соответствующего фермента пируватдегидрогеназного комплекса

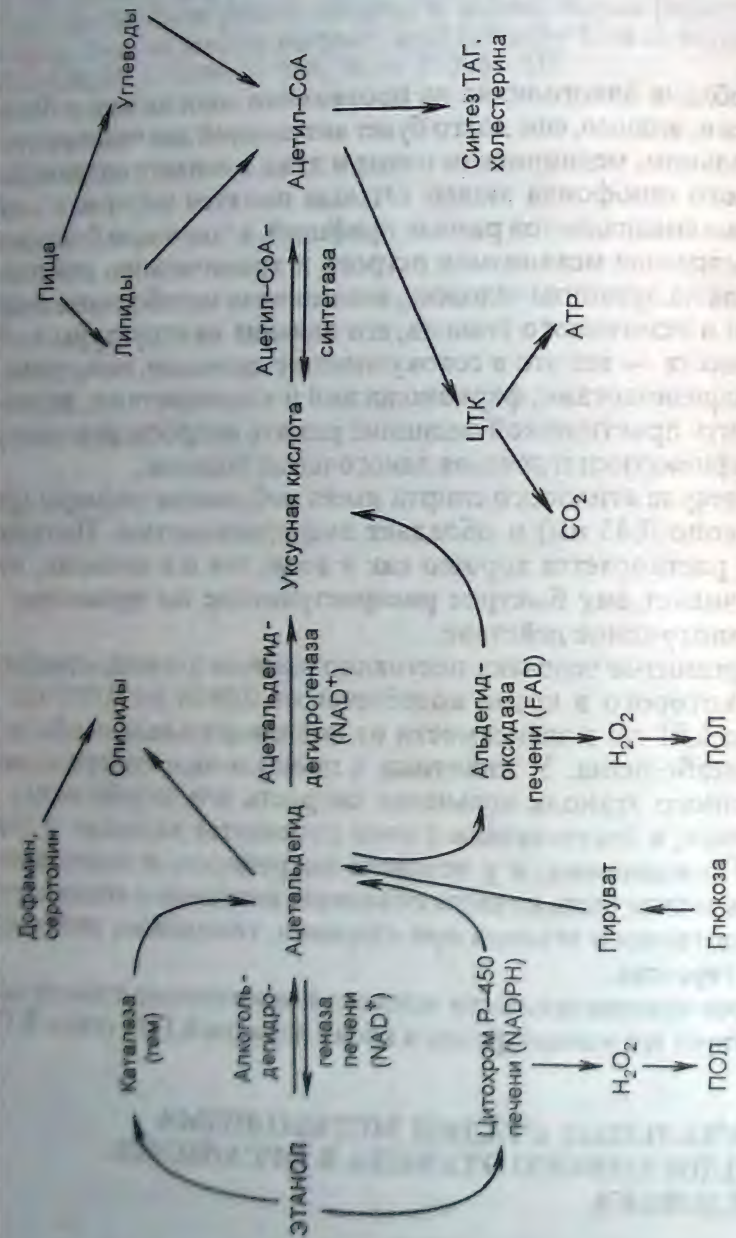


Рис. 8.1. Метаболизм эндогенного и экзогенного этилового спирта в организме человека. ЦТК — цикл трикарбоновых кислот.

Таблица 8.1

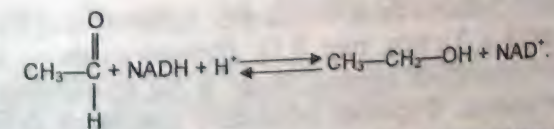
Эффективные дозы и концентрации этилового спирта для человека

ЭТАНОЛ В КРОВИ, г/л			
Эндогенный этанол (норма)	0,0004—0,001—0,01		
Порог чувствительности к экзогенному этанолу	0,1		
Наркотическое состояние	3,0—4,0		
АЦЕТАЛЬДЕГИД В КРОВИ, г/л			
Эндогенный ацетальдегид (норма)	0—0,0001 (в 100—1000 раз меньше содержания эндогенного этанола)		
ЭФФЕКТЫ РАЗНЫХ ДОЗ ЭКЗОГЕННОГО ЭТАНОЛА			
Опьянение	В граммах на 1 кг массы тела	Всего в граммах на 70 кг массы тела	Концентрация в крови, г/л
Слабое	0,2—0,5	15—35	Менее 1,5
Среднее	1,5—2,0	105—140	1,5—2,5
Сильное	Более 2,0	Более 140	Более 2,5

(аналогично образованию Ац и этанола при спиртовом брожении у некоторых дрожжей и бактерий). Допускается возможность образования этанола микрофлорой кишечника и дыхательных путей.

Концентрация эндогенного Ац в организме примерно в 100—1000 раз меньше, чем эндогенного этанола. В крови Ац практически не определяется вследствие низкой проницаемости мембран для Ац и ковалентного связывания Ац белками плазмы и эритроцитов.

Эндогенный Ац превращается в этанол в обратимой реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназой (АДГ):



При физиологических условиях равновесие реакции смещено вправо.

АДГ — это NAD-зависимый фермент, содержащийся в основном в печени (95 %), а также в мозге и других органах (почки, легкие, кишечник) и локализованный главным образом в цитозоле клетки. Фермент является димером, состоящим из

идентичных или близких по первичной структуре полипептидных цепей, кодируемых аллелями одного гена. В популяции людей распространено несколько изоферментов АДГ, обусловленных наличием разных аллелей. Типичными для европейцев являются изоферменты АДГ₂1(β₁β₁), АДГ₃2(γ₂γ₂) и др. В активный центр каждого мономера АДГ входят атом цинка в комплексе с тиогруппами двух молекул цистеина.

Этанол более легко, чем Ац, проходит через мембраны и примерно в 100 раз менее токсичен. В то же время Ац в небольших физиологических концентрациях необходим в митохондриях как позитивный регулятор транспорта электронов в дыхательной цепи. При более высоких концентрациях в клетке экзогенных этанола и Ац тормозится транспорт электронов в дыхательной цепи. Ац связывает и блокирует убихинол QH₂. Нарушения в дыхательной цепи возникают также вследствие угнетения экзогенным Ац NADH-дегидрогеназы.

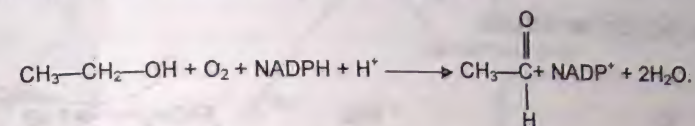
Экзогенный этанол постоянно поступает в организм человека в небольших количествах (до 4—5 г в сутки) с некоторыми пищевыми продуктами (хлеб, соки, кефир и др.) и эпизодически — со спиртными напитками. Такой этанол практически весь быстро всасывается в желудке (20—30 %) и в тонкой кишке (70—80 %) путем диффузии. Через несколько минут после приема алкоголь можно обнаружить в крови, а максимальная концентрация его в крови определяется через 30—60 мин. Этанол быстро распределяется в организме благодаря хорошей растворимости в воде. Наиболее высокой является концентрация этанола в таких органах, как печень, легкие, почки. У женщин содержание воды из расчета на 1 кг массы тела меньше, чем у мужчин, поэтому равные дозы этанола могут вызвать у женщин более выраженные эффекты.

В фазе элиминации около 10 % введенного этанола выводится в неизменном виде с воздухом, мочой, потом, а 90 % окисляется. Метаболизм этанола начинается уже в клетках слизистой оболочки полости рта и продолжается во многих органах и тканях, но главным образом в печени (70—95% окисляемого этанола).

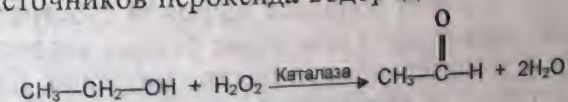
Экзогенный этанол окисляется как минимум тремя путями и превращается в Ац (см. рис. 8.1). *Первый путь* — цитозольная АДГ катализирует превращение в Ац примерно 80 % экзогенного этанола. Фермент обладает широкой субстратной специфичностью и может дегидрировать разные спирты. Среди людей встречаются отдельные индивиды с высокой и низкой активностью АДГ. Около 80 % людей в монголоидной популяции и только 5—20 % европейцев обладают АДГ высокой активности, обеспечивающей быстрое образование Ац из экзогенного этанола. Это связано с преобладанием у них

нетипичных для европейцев изоферментов АДГ₂2—1(β₂β₁) и АДГ₃2(β₂β₂).

Второй путь — окисление экзогенного этанола (10—20 %) катализируется цитохромом Р-450 (изоферментом Р-450IIE₁) и реализуется в гладком эндоплазматическом ретикулеуме клеток печени при участии кислорода и NADPH:



Данная микросомальная этанолюкисляющая система (МЭОС) является, во-первых, индуцибельной (индуктор — этанол, другие спирты, лекарственные средства типа барбитуратов и др.). При хроническом алкоголизме окисление этанола ускоряется на 50—70 % за счет индукции цитохрома Р-450 с гипертрофией эндоплазматического ретикулаума. Одновременно ускоряется биотрансформация лекарственных веществ при участии цитохрома Р-450IIE₁, обладающего относительной специфичностью к субстрату. Во-вторых, величина константы Михаэлиса K_m цитохрома Р-450 больше, чем АДГ. Таким образом, принципиальные отличия МЭОС от АДГ (индуцибельность, высокие значения K_m, использование восстановленной формы кофермента NADPH) обеспечивают ее включение для окисления экзогенного этанола при его достаточно высокой концентрации. Индуцибельность цитохрома Р-450 является одной из причин возникновения толерантности (устойчивости) к алкоголю у больных. Кроме основной реакции, цитохром Р-450 катализирует также образование активных форм кислорода (O₂[•], H₂O₂), которые активируют перекисное окисление липидов (ПОЛ) в печени и других органах. Одновременно включается *третий* — минорный *путь* — окисление экзогенного этанола (2 %) за счет образующегося из различных источников пероксида водорода:

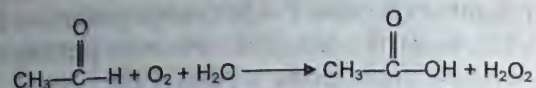


Наиболее активно окисление этанола при участии каталазы происходит в пероксисомах клеток.

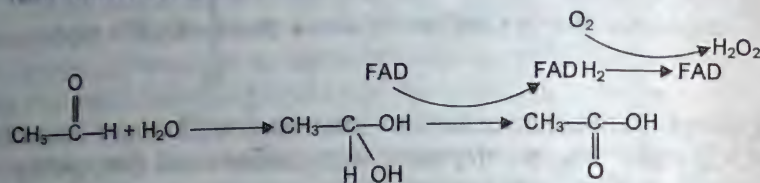
8.2. МЕТАБОЛИЗМ АЦЕТАЛЬДЕГИДА

Ацетальдегид (Ац) подвергается дальнейшему окислению до уксусной кислоты (см. рис. 8.1). Возможны две реакции. Одна реакция протекает при высоких концентрациях Ац, об-

разующегося из экзогенного этанола, и катализируется индуцибельной альдегидоксидазой — FAD-зависимым ферментом печени:

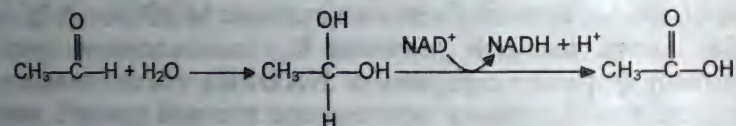


или более детально:



При этом генерируются не только пероксид водорода, но и другие активные формы кислорода, что приводит к активации ПОЛ.

Окисление Ац при участии оксидаз — это минорная реакция. Основной является другая необратимая реакция, катализируемая NAD-зависимой ацетальдегиддегидрогеназой (АцДГ):



Образующаяся уксусная кислота при участии АТР, СоА-SH и ацетил-СоА-синтетазы превращается в ацетил-СоА, который вступает в цитратный цикл или используется для синтеза жирных кислот, холестерина, триацилглицеринов и β-оксибутирата (см. рис. 8.1).

АцДГ представлена в клетках разных органов (почки, клетки эпителия слизистой оболочки желудка и кишечника, эритроциты), но больше всего ее в печени (40 % Ац метаболизируется в печени). Фермент обладает широкой субстратной специфичностью, катализируя окисление разных альдегидов; содержит цинк и значительное количество цистеина. Для проявления его активности необходимы тиогруппы. При лечении алкоголизма используются ингибиторы АцДГ: тетурам (ди-сульфирам, антабус), цианамид (циамид) и др.

Существует несколько изоферментов АцДГ печени человека. Из них следует выделить митохондриальную АцДГ с высоким сродством к Ац и цитоплазматическую АцДГ с несколько меньшим сродством. При хроническом алкоголизме, для которого характерно повышение концентрации Ац в крови и цитозоле клетки, возрастает активность цитоплазматической АцДГ.

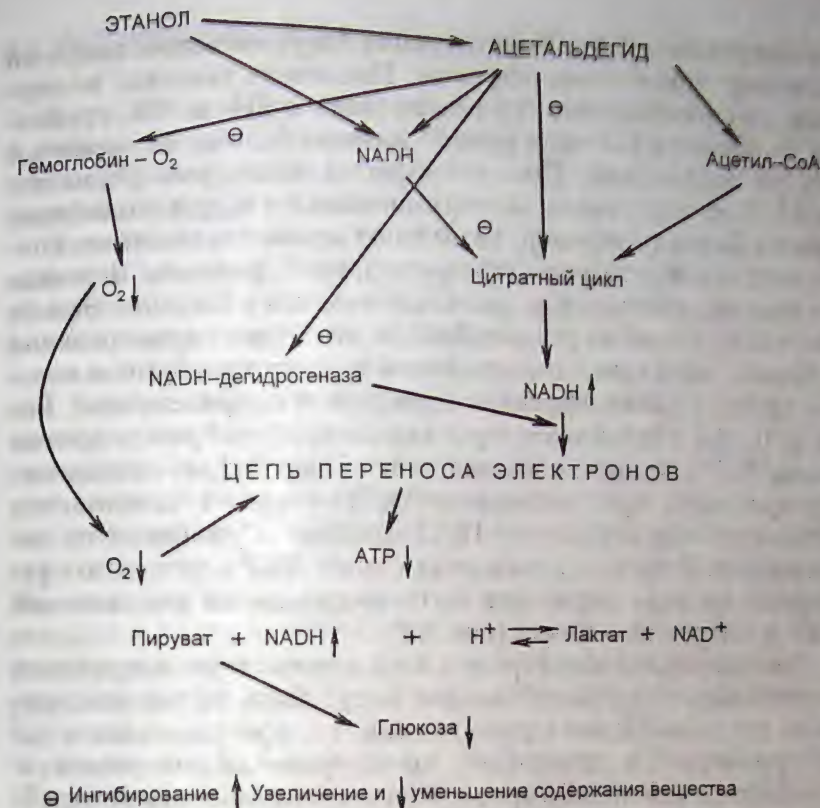


Рис. 8.2. Влияние продуктов метаболизма этанола на энергетический обмен.

В цитозоле неповрежденных алкоголем гепатоцитов около 80 % АДГ и 20 % АцДГ, а в митохондриях — 20 % АДГ и 80 % АцДГ от активности ферментов во всей клетке. При поступлении в клетку экзогенного этанола, который легко проходит через мембраны, максимальная концентрация Ац создается в цитозоле, а наиболее низкая — в матриксе митохондрий. Это связано с указанными различиями в распределении АДГ и АцДГ внутри клетки и с малой проницаемостью мембран для Ац. Если доза экзогенного этанола была небольшой (0,2—0,5 г на 1 кг массы тела), то умеренное повышение концентрации Ац в клетке не приводит к токсическим эффектам, в том числе к ингибированию NADH-дегидрогеназы. Ац и этанол быстро и согласованно окисляются в цитозоле и митохондриях с образованием NADH, уксусной кислоты, ацетил-СоА и АТР (см. рис. 8.1). Эти процессы сопровождаются усилением поглощения кислорода тканями. При более значительных дозах этанол интенсивно превращается в Ац с использованием всех трех путей метаболизма. Нарушается согласованность между окис-

лением этанола и Ац. Концентрация Ац резко возрастает, и он вызывает токсические эффекты. Последние связаны, во-первых, со способностью Ац реагировать с SH- и NH₂-группами (особенно с ε-аминогруппой лизина) белков, ферментов и других соединений. Инактивируются некоторые ферменты (NADH-дегидрогеназа, моноаминоксидаза и др.), модифицируются белки (например, возникают сшивки в эластине, коллагене), нуклеопротеины (хроматин), липопротеины. Возникают многие нарушения: торможение синтеза и секреции белков клетками, ускорение распада белков, угнетение полимеризации тубулина, искажение транспортной функции альбумина плазмы крови, а также эффектов гормонов и нейропептидов. Во-вторых, Ац увеличивает проницаемость мембран и приток ионов Na⁺ в клетки, вызывая отек и дистрофию последних. Этому способствует связывание Ац SH-групп глутатиона, что дополнительно активирует ПОЛ мембран и усиливает их повреждение. В-третьих, снижается синтез АТФ в результате угнетения Ац ряда ферментов митохондриальной дыхательной цепи и цитратного цикла (рис. 8.2).

Повышенные концентрации Ац в клетках при поступлении значительных количеств этанола могут быть не компенсированы его дальнейшим метаболизмом, т.е. превращением в уксусную кислоту и ацетил-СоА. Ац поступает во внеклеточную жидкость, в том числе в кровь. При систематическом употреблении алкоголя концентрация Ац в крови может превышать 0,0001 г/л.

Итак, необходимо выделить следующие эффекты повышенных доз этанола (1,5—2,0 г/кг, или около 100—150 г):

- увеличение в цитозоле и митохондриях клетки концентрации Ац вследствие нарушения согласованности в окислении этанола и Ац;
- повышение в цитозоле и несколько меньше в митохондриях относительной доли NADH (отношение NADH/NAD⁺ увеличивается). Это связано с интенсивной работой NAD-зависимых АДГ и АцДГ, т.е. превращением этанола в Ац и уксусную кислоту;
- угнетение активности NADH-дегидрогеназы митохондриальной дыхательной цепи при воздействии этанола и особенно Ац. Снижаются окисление субстратов при участии NAD-зависимых дегидрогеназ и поглощение кислорода митохондриями. Окисление янтарной и аскорбиновой кислот при этом не тормозится;
- угнетение NADH-дегидрогеназы Ац препятствует окислительной регенерации NAD⁺ и еще более увеличивает относительный избыток NADH.

8.3. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭТАНОЛА

Биологическое действие этанола и образующегося из него Ац многогранно. Условно можно выделить физико-химические, мембранотропные, метаболические, наркотические и токсические эффекты этанола.

Этанол относительно индифферентен в химическом отношении. Амфифильность молекулы этанола обеспечивает его распределение в организме как в водных средах, так и в липидных фазах (мембранах). Для этанола не существует специальных рецепторов как, например, для классических наркотиков. Все это обуславливает, во-первых, неспецифичность действия этанола на центральную нервную систему подобно другим средствам для наркоза алифатического ряда. Этанол усиливает проницаемость гематоэнцефалического барьера, в том числе для других веществ, проникает в мозг, нарушает структуру и функции мембран и вызывает метаболические изменения в клетках мозга (см. далее). Во-вторых, эффективная доза этанола в 1000 раз и более выше, чем для опиоидов, которые специфически реагируют со своими рецепторами: «эйфоризирующая» доза этанола составляет 0,2—0,5 г/кг, а морфина — 0,1 мг/кг.

Физико-химические эффекты этанола рассмотрены ранее. По существу они определяют его мембранотропное действие. Кроме того, к физико-химическим эффектам можно отнести способность этанола повышать осмотическое давление плазмы крови, например, при концентрации 1 г/л, сопоставимой с концентрацией глюкозы в крови.

8.4. ОСТРАЯ АЛКОГОЛЬНАЯ ИНТОКСИКАЦИЯ

При небольшой «эйфоризирующей» дозе (0,2—0,5 г/кг) на первый план выступает мембранотропное действие этанола — его распределение в липидной фазе мембран и изменение функционирования мембранных рецепторов и ферментов. Этанол активирует аденилатциклазу мембран и угнетает активность α₂-адренергических рецепторов в окончании нейронов (эти рецепторы являются негативными регуляторами секреции катехоламинов). Из депо пресинаптической мембраны в щель адренергического синапса освобождается норадреналин, особенно в тех участках мозга (гипоталамус, средний мозг), которые регулируют эмоциональное состояние и мотивационные процессы. Этанол угнетает системы обратного захвата катехоламинов пресинаптической мембраной и их ферментативной инактивации. Возникает раздражение адренергических струк-

тур мозга, что вызывает эйфорию и возбуждение. Эта фаза подкрепляется энергетически: в печени и других органах быстро и согласованно окисляются этанол и Ац и образуется АТР. Токсические явления не возникают. В результате такой стресс-реакции нервной системы на этанол происходит также дополнительная секреция катехоламинов из надпочечников и повышается их уровень в крови. Последнее приводит к усилению гликогенолиза в печени и кратковременной глюкоземии. Легкое алкогольное опьянение ограничивается психотропными эффектами (эйфория, возбуждение). Концентрация этанола в крови обычно не превышает 1,5 г/л (см. табл. 8.1).

При более высоких дозах этанола развивается среднее алкогольное опьянение с психотропными и токсическими эффектами (концентрация алкоголя в крови 1,5—2,5 г/л при дозе 1,5—2,0 г/кг) или тяжелая алкогольная интоксикация (концентрация алкоголя в крови более 2,5 г/л при дозе более 2 г/кг) (см. табл. 8.1). При этом происходят следующие биохимические изменения:

- наряду с катехоламиновой эйфорией усиливаются другие мембранотропные эффекты этанола (уменьшение вязкости мембран или их «текучесть»), наступают более глубокие нарушения функционирования мембранных рецепторов и ферментов (см. рис. 8.2);
- в цитозоле и митохондриях клетки повышается концентрация Ац и создается относительный избыток NADH. Ац и NADH являются главными медиаторами экзогенного этанола, которые определяют его способность изменять свойства белков, ферментов и нарушать разнообразные метаболические процессы. В частности, гиперпротонемия (избыток NADH) способствует восстановлению кетокислот в оксикислоты и увеличению содержания последних (яблочной, молочной, β -оксимасляной и др.). Кислотно-щелочное равновесие сдвигается в сторону ацидоза. Уменьшается окисление изолимонной, яблочной, глутаминовой, β -оксимасляной кислот, этанола, Ац как вследствие дефицита NAD⁺, так и в результате прямой инактивации Ац NAD-зависимых дегидрогеназ (см. рис. 8.2);
- снижается скорость реакций не только дыхательной цепи, но и цитратного цикла. Последнее связано с рядом обстоятельств: дефицит NAD⁺ и/или ингибирование некоторых NAD-зависимых дегидрогеназ; дефицит кетокислот; дефицит CoA-SH вследствие его «замораживания» в «этанольном» ацетил-CoA и прямой реакции Ац с тиольными группами CoA-SH; модификация гемоглобина Ац с уменьшением его сродства к кислороду (см. рис. 8.2). Все это тормозит поглощение кислорода клетками;

- угнетение тканевого дыхания, уменьшение выхода АТР вызывают торможение физиологической активности клеток. Это является одной из причин развития наркотического состояния мозга (при концентрации этанола в крови около 3—4 г/л);
- для энергетического обеспечения клеток возникает компенсаторная реакция — активация FAD-зависимой сукцинатдегидрогеназы (СДГ), которая катализирует окисление эндогенной янтарной кислоты. Активация СДГ и окисление янтарной кислоты характерны как для интенсивного однократного, так и особенно для систематического употребления алкоголя. Имеются данные о том, что механизм активации СДГ связан с уменьшением свободного убихинола QH₂, ингибитора СДГ, который ковалентно связан Ац;
- равновесие реакции превращения пировиноградной кислоты в молочную сдвинуто в сторону образования молочной кислоты:



Уменьшается образование пировиноградной кислоты. Ац угнетает карбоксикиназу фосфоенолпировиноградной кислоты. Вследствие этого снижается интенсивность глюконеогенеза в печени, что проявляется в виде гипоглюкоземии (см. рис. 8.2), особенно на фоне нерегулярного питания и физических нагрузок в сочетании с алкоголем.

8.5. ХРОНИЧЕСКАЯ АЛКОГОЛЬНАЯ ИНТОКСИКАЦИЯ

Для хронической алкогольной интоксикации характерно следующее:

- усилены метаболические нарушения и изменения мембран, как при острой алкогольной интоксикации;
- в результате систематического поступления значительных количеств этанола активируются АДГ, цитохром P-450, увеличивается скорость образования Ац и содержание его в печени, мозге и других органах. Это является главной причиной алкогольной интоксикации. Последняя наиболее выражена у людей монголоидной расы, для которых характерны высокоактивная АДГ и низкоактивная АцДГ. Монголоиды дают часто яркую токсическую «флаш»-реакцию на этанол (жар, покраснение, тошнота, рвота). Поэтому среди них по сравнению с европейцами частота алкогольной болезни меньше. Аналогично на принципе

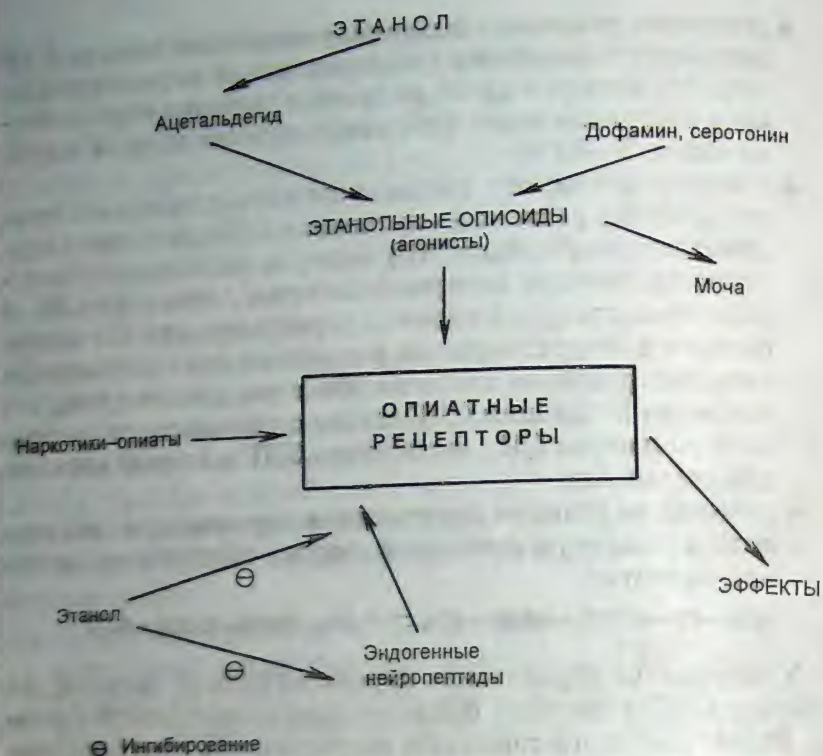


Рис. 8.3. Наркотические эффекты этанола.

создания несоответствия между этанолом и Ац основано использование ингибиторов АцДГ для лечения алкоголизма;

- «алкогольный» Ац вступает в реакцию с биогенными аминами (дофамином, серотонином) или их метаболитами. В результате образуются сальсолинол, тетрагидропаверолин, β-карболины и другие морфиноподобные вещества (рис. 8.3), которые реагируют с опиатными рецепторами, являясь еще одним из факторов развития алкогольной эйфории и влечения к алкоголю. Постепенно «алкогольные» опиоиды, конкурируя с эндогенными опиоидными нейропептидами, подменяют их и это приводит к снижению концентрации мет-энкефалина и β-эндорфина в результате угнетения этанолом их биосинтеза и активации ферментативной деградации. Имеются также данные о прямом влиянии этанола на опиатные рецепторы — о снижении их сродства к опиоидным пептидам;
- периодический выброс норадреналина в синаптическую щель адренергического синапса приводит у больного алкоголизмом к тренировке систем обратного захвата и де-

градации катехоламинов. Кроме того, этанол тормозит активность дофамин-β-гидроксилазы, т.е. угнетает реакцию дофамин → норадреналин. Поэтому концентрация последнего в промежутках между приемами этанола снижается, что является одной из причин алкогольной депрессии при отмене этанола. Этанол активирует тирозингидроксилазу, увеличивая скорость образования дофамина (тирозин → ДОФА → дофамин) и изменяет активность ферментов шунта γ-аминомасляной кислоты. В случае прекращения приема этанола либо снижении его дозы у больного тяжелой формой хронического алкоголизма развивается синдром отмены, или абстиненции (возбуждение, психоз, бред), одной из причин которого является повышение концентрации дофамина и снижение концентрации γ-аминомасляной кислоты в мозге. Поэтому для лечения разных форм хронического алкоголизма используют препараты, нормализующие обмен норадреналина, дофамина, серотонина, γ-аминомасляной кислоты;

- постоянное окисление этанола приводит к образованию из него значительных количеств ацетил-СоА. До 20—30 % энергетических затрат алкоголика может обеспечиваться за счет этанола (удельная энергетическая ценность 7,1 ккал/г). При больших дозах этанола часть «этанольного» ацетил-СоА не окисляется в реакциях цитратного цикла и дыхательной цепи, интенсивность которых снижена, а используется в печени для синтеза жирных кислот, ТАГ, холестерина и образования ЛОНП. Часть жирных кислот в клетках печени и сердца превращается в сложные эфиры (этанол — жирная кислота) при участии специальной ферментной системы. В итоге в крови больного алкоголизмом (до стадии цирроза печени) регистрируются гипертриацилглицеринемия, общая гиперхолестеринемия с повышением уровня холестерина в составе ЛВП (α-холестерин), увеличение содержания ЛОНП;
- изменяется состав мембран разных клеток: увеличивается содержание в них холестерина, повышается жесткость (ригидность) мембран, снижается их антиокислительная активность вследствие уменьшения количества фосфолипидов. Последнее обстоятельство в сочетании с генерацией активных форм кислорода (O_2^+ , H_2O_2 , HO^+) при окислении этанола с участием цитохрома Р-450 и окислении Ац с участием альдегидоксидазы (см. рис. 8.1) приводит к патологической активации ПОЛ мембран и их повреждению;
- особенно значительно нарушаются метаболизм и структура мембран в печени. Основные факторы алкогольной

го поражения печени: активные формы кислорода, ПОЛ мембран, повышенное содержание Ац, жирных кислот (в результате их синтеза в печени и катехолиндуцированно-го липолиза в жировой ткани), ТАГ и NADH. Нарушается образование ЛОНП в результате токсического повреждения гепатоцитов и недостаточного поступления аминокислот из кишечника, как следствие затрудняется экспорт ТАГ из печени в жировую ткань. Ац индуцирует синтез коллагена в гепатоцитах. В итоге хронический алкоголизм характеризуется развитием следующих патологических состояний печени: ожирение — жировой гепатоз — фиброз — гепатит — цирроз;

- при выраженных формах хронического алкоголизма на фоне ожирения печени возможно общее истощение, связанное с мобилизацией жиров в жировой ткани, торможением глюконеогенеза, нерегулярным и неправильным питанием, нарушением обмена витаминов (B_6 , B_{12} , фолиевая кислота и др.) и металлов;
- снижение биосинтеза тестостерона как результат угнетения NADP- и NAD-зависимых ферментов, что приводит к относительному и абсолютному избытку эстрогенов, нарушению половой функции и феминизации мужчин. Из-за увеличения жесткости мембран уменьшается их проницаемость для глюкозы и ослабляется регуляторное влияние инсулина на обмен углеводов;
- вследствие гиперпротонемии и ацидоза повышается содержание мочевой кислоты в крови, что связано со снижением ее растворимости и удаления через почки.

8.6. АЛКОГОЛЬНАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ

Алкогольная толерантность — устойчивость организма к повышенным дозам этанола. В ее основе лежит, во-первых, способность модифицированных мембран и их рецепторов, ферментов противостоять мембранотропному эффекту этанола. По-видимому, мембраны с повышенным содержанием холестерина и более ригидные становятся менее проницаемыми для этанола. Во-вторых, метаболический компонент толерантности связан с адаптацией ферментных систем к повышенным концентрациям этанола и Ац. Окисление этанола в Ац ускоряется в результате активации АДГ и цитохрома P-450, а окисление Ац в уксусную кислоту — вследствие повышения активности цитозольной АцДГ и альдегидоксидазы. Часть избыточного Ац печени переходит в кровь и окисляется в других органах.

8.7. АЛКОГОЛЬНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ

Алкогольная зависимость, во-первых, также может быть связана с изменениями мембран, которые полноценно не функционируют в отсутствие этанола. Во-вторых, образующиеся «алкогольные» опиоиды способствуют развитию наркотической зависимости. В-третьих, снижение концентрации норадреналина в промежутках между приемами этанола вызывает депрессию и влечение к алкоголю, прием очередной дозы которого повышает содержание как норадреналина, снижающего депрессию, так и «алкогольных» опиоидов, возмещающих недостаток эндогенных опиоидных нейропептидов. И, в-четвертых, в периоды между употреблением этанола у больного возникает недостаточность Ац. Это связано с тем, что индуцированная субстратом цитозольная АцДГ очень активна и катализирует быстрое окисление Ац. Наряду с этим уменьшается скорость образования эндогенного Ац вследствие ингибирования митохондриальной пируватдекарбоксилазы или снижения содержания пирувата. Пониженная концентрация Ац (для хронического алкоголика «нормальное» содержание Ац является более высоким) и особенно эндогенного Ац нарушает транспорт электронов в дыхательной цепи. Уменьшаются потребление кислорода и окисление многих субстратов. Избыток электронов в дыхательной цепи приводит к образованию активных форм кислорода и активации перекисных процессов на фоне энергетического голода клетки. Перечисленные биоэнергетические нарушения, также связанные с развитием алкогольной зависимости, могут быть купированы повышением концентрации Ац путем введения очередной дозы алкоголя или такими препаратами, как паральдегид (тример Ац) или барбитураты. Последние усиливают образование Ац, так как индуцируют цитохром P-450 и одновременно угнетают NADH-дегидрогеназу, что соответственно ускоряет образование Ац и тормозит его окисление при участии АцДГ вследствие недостатка NAD^+ .

8.8. СИНДРОМ ОТМЕНЫ

Крайняя форма проявления алкогольной зависимости — синдром отмены, или абстиненции. Механизм развития этого синдрома связан с рядом различных факторов: изменением содержания катехоламинов и γ -аминомасляной кислоты, образованием «алкогольных» опиоидов, торможением образования эндогенных опиоидных нейропептидов и, наконец, с недостаточностью эндогенного Ац.

8.9. ЛЕЧЕНИЕ

Для лечения хронического алкоголизма используются или предлагаются следующие препараты:

- угнетающие активность АцДГ и увеличивающие содержание токсического ацетальдегида: тетурам (дисульфiram, антабус), циамида и другие препараты, сенсibiliзирующие организм к алкоголю (метронидазол, фуразолидон);
- нормализующие обмен катехоламинами, серотонина и γ -аминомасляной кислоты (антидепрессанты, соли лития, нейролептики, агонисты рецепторов дофамина, пирacetам);
- нормализующие обмен эндогенных опиоидных нейропептидов;
- блокирующие рецепторы, с которыми связываются «алкогольные» опиоиды (налоксон);
- препараты, используемые для детоксикации: глицин, связывающий ацетальдегид с образованием ацетилглицина, янтарная кислота и витамин С, нормализующие энергетический обмен и образование АТФ.

8.10. БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ СИСТЕМАТИЧЕСКОГО УПОТРЕБЛЕНИЯ АЛКОГОЛЯ

При систематическом употреблении алкоголя биохимическими маркерами являются:

- 1) повышенное содержание в крови этанола (более 0,01 г/л), ацетальдегида (в норме не обнаруживается или не более 0,0001 г/л), оксикислот (молочной, яблочной, β -оксимасляной), ТАГ, ЛОНП, общего холестерина и холестерина ЛВП, мочевой кислоты, водородных ионов (ацидоз), γ -глутамилтранспептидазы, щелочной фосфатазы, АсАТ (увеличение отношения АсАТ/АлАТ), глутаматдегидрогеназы, β -оксибутиратдегидрогеназы. Увеличено осмотическое давление плазмы крови;
- 2) уменьшение в крови содержания глюкозы, кетокислот (пировиноградной, щавелевоуксусной, α -кетоглутаровой), тестостерона, кальция;
- 3) обнаружение в моче сальсоинола (опиоид);
- 4) увеличение в печени (биоптаты) отношения NADH/NAD^+ и активация цитохрома Р-450 (ускорена биотрансформация лекарственных веществ).

За последние годы выявлены и, возможно, будут внедрены в практику новые биохимические маркеры, на основе которых предложены алгоритмы для экспертизы однократного и хронического употребления этанола. Например, при отсутствии в крови диагностически значимых количеств этанола (т.е. не выше уровня эндогенного этанола) можно считать, что пациент не употреблял алкоголь за последние 6—8 ч. Однако обнаружение в крови этиловых эфиров жирных кислот даже при отсутствии этанола свидетельствует о приеме спиртных напитков в течение предшествующих 24 ч. Независимо от обнаружения этанола или указанных эфиров выявление в крови углеводдефицитного трансферрина доказывает систематическое употребление алкоголя и нарушение функций печени. В неповрежденной печени здоровых людей образуется нормальный трансферрин, являющийся гликопротеином с двумя N-связанными углеводными фрагментами (сиаловыми кислотами). При алкогольном повреждении печени нарушается гликозилирование трансферрина и образуются его дефектные формы без сиаловой кислоты или содержащие одну сиаловую кислоту. В США, Европе и Австралии используется несколько разных методов определения изоформ трансферрина, основанных на их разделении при ионообменной или жидкостной хроматографии, изоэлектрическом фокусировании с последующим иммуноанализом фракций. Установлено, что при наличии алкогольной зависимости на фоне систематического употребления алкоголя курение еще более повышает уровень сывороточного углеводдефицитного трансферрина и, следовательно, также нарушает функции печени.

В последние годы в разных странах, в том числе и в России, дискутируется вопрос о пользе алкогольных напитков. Современникам напоминают об известной с древних и средних веков энотерапии — системе лечения ряда заболеваний разными винами. История медицины знает периоды использования чистого спирта в качестве самостоятельного лекарства. Общеизвестно употребление алкоголя при простудных заболеваниях, его назначение во время войн и конфликтов при травматическом шоке и стрессах, особенно при недостатке других лекарственных средств. Некоторые лекарственные препараты изготавливают на спиртовых растворах.

Все эти факты (а возможно, и мифы) связаны с тем, что этанол в отличие от наркотиков является эндогенным метаболитом человека, и поэтому существует определенный необходимый для организма диапазон содержания эндогенного этанола, функции которого пока четко не выяснены. Можно лишь предполагать, что эндогенный этанол, как и экзогенный, активизирует высвобождение норадреналина и дофамина из пре-

синаптических структур в лимбических отделах и в среднем мозге, т.е. в отделах ЦНС, относящихся к системе "награды" мозга и регулирующих эмоциональное состояние и мотивационные процессы. Вероятно, именно поэтому снижение концентрации эндогенного этанола (при старении, голодании, авитаминозах, стрессах) индуцирует у человека потребность в употреблении алкогольных напитков. Есть мнение, что определенные физические упражнения, музыка, психотерапия могут усилить выработку эндогенного этанола, с чем, возможно, и связан их благоприятный эффект.

В настоящее время в научной и околонуучной литературе настойчиво рассматривается вопрос о профилактике атеросклероза и ишемической болезни сердца (ИБС) с помощью систематического употребления алкоголя в количестве от одной дозы через день до двух доз ежедневно (одна доза составляет 13 г чистого этанола). В основе подобных утверждений лежат отдельные наблюдения о снижении частоты развития ИБС и инфаркта миокарда при выполнении таких рекомендаций, а также научные факты об увеличении в крови содержания холестерина ЛВП и снижении свертываемости крови при систематическом употреблении алкоголя. Более строгий эпидемиологический анализ показал, что риск возникновения ИБС и инфаркта миокарда существенно не снижается при употреблении алкоголя в небольших дозах для мужчин моложе 35 лет и для женщин предклимактерического периода, а также для тех, кто старается избежать этих болезней другими способами (диета, физическая активность, отказ от курения, аспирин).

Относительно повышения уровня холестерина ЛВП (α -холестерин) в крови при систематическом употреблении алкоголя надо заметить, что, во-первых, не доказан антиатерогенный эффект "алкогольных" ЛВП. Во-вторых, в результате привыкания к алкоголю, возникновения алкогольной зависимости и толерантности многие люди будут постоянно повышать указанную профилактическую дозу алкоголя, что вызовет отрицательные медицинские и социальные последствия. При выраженном алкоголизме содержание ЛВП в крови вследствие повреждения печени может даже снизиться. Следовательно, рекомендовать алкоголь для профилактики атеросклероза и ИБС пока преждевременно.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ

1. При систематическом употреблении алкоголя в крови повышается активность следующих ферментов:
А. γ -Глутамилтранспептидазы.

- Б. Лактатдегидрогеназы.
- В. Щелочной фосфатазы.
- Г. Кислой фосфатазы.
- Д. Аспаратаминотрансферазы.
- Е. β -Оксибутиратдегидрогеназы.

2. При систематическом употреблении алкоголя в крови уменьшается содержание:

- А. Глюкозы.
- Б. Натрия.
- В. Триглицеридов.
- Г. Пировиноградной кислоты.
- Д. Тестостерона.
- Е. Кальция.

3. При систематическом употреблении алкоголя в крови увеличивается содержание:

- А. Мочевой кислоты.
- Б. Этилового спирта (более 0,01 г/л).
- В. Креатинина.
- Г. Триглицеридов.
- Д. Мочевины.
- Е. Молочной кислоты.

4. Повреждение внутренних органов («висцеральный алкоголизм») развивается в результате воздействия повышенных концентраций следующих веществ:

- А. Мочевины.
- Б. Ацетальдегида.
- В. NADH.
- Г. Холестерина.
- Д. Ионов водорода.
- Е. Активных форм кислорода.

5. Этанол и образующийся из него ацетальдегид оказывают на организм человека следующие эффекты:

- А. Физико-химические.
- Б. Мембранотропные.
- В. Метаболические.
- Г. Токсические.
- Д. Наркотические.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анохина И.П. Нейробиологические аспекты алкоголизма //Вестн. АМН СССР. — 1988. — № 3. — С.21—27.
2. Билибин Д.П., Дворников В.Е. Патология физиология алкогольной болезни и наркомании. — М.: Изд-во РУДН, 1991. — 103 с.
3. Бочков Н.П., Филиппова Т.В., Колесова Г.Н. Алкоголь и наследственность //Вестн. АМН СССР. — 1988. — № 3. — С. 32—36.
4. Иванец Н.Н., Валентик Ю.В. Алкоголизм. — М.: Наука, 1988. — 174 с.
5. Киятин Е.А. Нейрофизиология и нейрохимия наркологической зависимости //Успехи совр. биол. — 1990. — Т. 109, № 1. — С. 130—145.

6. Комиссарова И.А., Ротенберг Ю.С., Мастероуло А.П. Механизмы действия этанола и подходы к коррекции обменных нарушений при хронической алкоголизации//ВНЦМДЛ, Медицина и здравоохранение, сер. «Терапия». — М., 1986. — Вып. 6. — 53 с.
7. Корнеев А.А., Комиссарова И.А. О биологическом значении ацетальдегида как клеточного регулятора дыхательной цепи митохондрий// Успехи совр. биол. — 1994. — Т. 114, № 2. — С. 212—221.
8. Семке В.Я., Галактионов О.К., Дорофеева Л.И. и др. Поиск биохимических факторов, участвующих в патогенезе алкоголизма в различных этнических популяциях// Вестн. РАМН. — 1996, № 12. — С. 49—56.
9. Успенский А.Е. Биологические маркеры употребления алкоголя//Клин. мед. — 1986. — № 6. — С. 128—135.
10. Успенский А.Е., Листвина В.П. Алкоголь и действие лекарств// Вопр. наркологии. — 1988. — № 3. — С. 51—56.

9.1. ПОНЯТИЕ О НЕСПЕЦИФИЧЕСКОМ И СПЕЦИФИЧЕСКОМ ИММУНИТЕТЕ

Иммунология — наука о составе, строении и функционировании иммунной системы. Эта наука имеет довольно короткую историю, насчитывающую около 100 лет. Термин «иммунитет» первоначально использовался для обозначения невосприимчивости организма к инфекции. В настоящее время под иммунитетом понимают свойство организма устранять попавшую в него любую чужеродную молекулу. Осуществляет это *иммунная система* — совокупность клеток, а также белков и пептидов, выделяемых этими клетками, участвующих в уничтожении чужеродных молекул.

Вещество, способное вызывать иммунный ответ, называется **антигеном**.

Ребенок рождается уже с некоторыми сформированными механизмами защиты, которые остаются в течение всей последующей жизни и носят неспецифический характер. Отсюда название «врожденный неспецифический иммунитет». Он наиболее эффективен при защите от микроорганизмов, грибов и многоклеточных паразитов.

Различают три компонента неспецифического иммунитета.

Физико-химический компонент: барьерная функция кожи и слизистых оболочек, повышенная кислотность пота и желудочного сока, особенности строения межклеточного матрикса, в котором протеогликановые агрегаты и гиалуроновая кислота препятствуют распространению микроорганизмов.

Гуморальный компонент: белки системы комплемента, участвующие в лизисе микроорганизмов и зараженных вирусами клеток организма, а также молекулы, облегчающие присоединение (адгезию) бактериальных клеток к поверхности фагоцитов. К ним относятся некоторые компоненты системы комплемента, С-реактивный белок. Молекулы, ускоряющие и усиливающие прикрепление объекта фагоцитоза к фагоциту называются *опсонинами* (от греч. opsonion — снабжение пищей).

Клеточный компонент включает большую часть белых клеток крови:



Рис. 9.1. Развитие разных клеток крови из полипотентной стволовой клетки.

- 1) лейкоциты (гранулоциты), к которым относят нейтрофилы (матеморфно-ядерные клетки), составляющие 50—95 % от всех лейкоцитов, эозинофилы (3—5 %) и базофилы (0,5—1 %);
- 2) моноциты и продукты их дифференцировки в тканях — макрофаги;
- 3) НК-клетки (естественные киллеры) — один из типов лимфоцитарных клеток;
- 4) тучные клетки.

Все клетки крови развиваются из полипотентных стволовых клеток (рис. 9.1), но в процессе дифференцировки приобретают специфические строение и функциональные свойства. Так, нейтрофилы (макрофаги) и макрофаги могут фагоцити-

ровать бактерии и грибы, поэтому их называют *фагоцитами*. Эозинофилы участвуют в борьбе с многоклеточными паразитами (например, гельминтами), базофилы и тучные клетки — в развитии воспалительной реакции, выделяя медиаторы воспаления (гистамин, серотонин, лейкотриены и т.д.). Благодаря действию медиаторов развиваются основные признаки воспаления. НК-клетки осуществляют иммунологический надзор за опухолевыми клетками и клетками, инфицированными вирусами, обнаруживают их и уничтожают.

В процессе жизни организм сталкивается с множеством чужеродных организмов и молекул, в ответ на это начинает вырабатываться *приобретенный, специфический иммунитет*. Особенности специфического иммунитета таковы, что при первой встрече эта часть иммунной системы только «учится» идентифицировать и различать структурные особенности чужеродной молекулы. После довольно длительного периода «изучения» специфические эффекторные клетки нейтрализуют и уничтожают чужеродные молекулы, часто привлекая механизмы неспецифического иммунитета. Одновременно в банк памяти откладывается информация о встрече с этим антигеном.

При повторной встрече с тем же антигеном возникает быстрая специфичная и мощная реакция, не дающая развиться болезни в случае попадания в организм бактериальной или грибковой инфекции.

Следовательно, для приобретенных иммунных реакций характерны три основных фундаментальных свойства:

1. **Высокая специфичность иммунитета.** Переболев некоторыми инфекционными болезнями, человек редко заболевает ими повторно. Те, кто переболел корью, имеют иммунитет против вируса кори, но не против других вирусов. Иммунная система настолько специфична, что может различать два белка, отличающихся по одной аминокислоте.
2. **Наличие иммунологической памяти о встреченном антигене.**
3. **Способность отличать «свое» от «чужого».** Нарушение в иммунной системе, приводящее к узнаванию «своего» как «чужого», вызывает разрушение собственных молекул организма и развитие аутоиммунных болезней.

Различают два основных типа специфического иммунного ответа.

1. **Гуморальный ответ** связан с выработкой антител (иммуноглобулинов) — особых белков, циркулирующих в крови и других жидкостях организма и способных специфически связываться с чужеродными молекулами. Связывание с антителами инактивирует вирусы и бактериальные токсины, блокирует

их способность связываться с рецепторами клеток-мишеней и проявлять свое инфицирующее и токсическое действие. Кроме того, антитела могут взаимодействовать с поверхностными антигенами микроорганизмов, образуя комплексы, которые узнают и уничтожают специализированные клетки (фагоциты). Эти комплексы могут также активировать особую систему белков крови, называемую комплементом, которая вызывает разрушение клеток микроорганизмов и зараженных клеток.

2. **Клеточный ответ** связан со специфическим узнаванием клетками иммунной системы антигенов, расположенных на поверхности других клеток организма (фрагменты вирусных белков и белков, образующихся при трансформации клеток). Специфическое взаимодействие антигенов с рецепторами клеток иммунной системы вызывает цепь событий, приводящих к уничтожению зараженных вирусом клеток до окончания его репликации или до начала интенсивного размножения собственных опухолевых клеток.

За специфичность иммунитета отвечают лимфоциты — одна из групп белых клеток крови. Лимфоциты развиваются из полипотентных стволовых клеток так же, как и другие клетки крови (см. рис. 9.1).

Два типа иммунного ответа осуществляются благодаря функционированию двух классов лимфоцитов.

В-лимфоциты вырабатывают антитела — главные молекулы гуморального иммунитета. Развитие В-лимфоцитов происходит в костном мозге взрослых или в печени у плода.

Т-лимфоциты развиваются в тимусе и отвечают за клеточный иммунитет. Различают три основных вида Т-лимфоцитов: *Т-киллеры*, или *цитотоксические Т-лимфоциты*, уничтожают клетки организма, зараженные вирусами, и вместе с В-лимфоцитами непосредственно участвуют в защите организма. Поэтому Т-киллеры и В-лимфоциты называют *эффекторными клетками*. Т-хелперы и Т-супрессоры играют регуляторную роль, соответственно усиливая или подавляя размножение и созревание других клеток иммунной системы. Их объединяют в группу *регуляторных клеток*.

Органы, в которых из клеток-предшественников развиваются соответствующие лимфоциты (тимус и костный мозг), называются *первичными лимфоидными органами*. Из них часть лимфоцитов мигрирует во *вторичные лимфоидные органы* (лимфатические узлы, селезенка, аппендикс, миндалины, аденоиды, пейеровы бляшки — групповые лимфатические фолликулы).

Антигены, проникающие в организм через кишечник, легкие, кожу, накапливаются в соответствующих лимфатических

узлах и там встречаются с лимфоцитами. Антигены, попавшие непосредственно в кровь, встречаются с лимфоцитами в селезенке и крови.

9.2. ТЕОРИЯ КЛОНАЛЬНОЙ СЕЛЕКЦИИ

Каждый лимфоцит в процессе развития приобретает способность реагировать с определенным антигеном, еще ни разу с ним не встретившись. На поверхности лимфоцитов имеются белки-рецепторы, специфично взаимодействующие с каким-либо антигеном. Такое связывание активирует лимфоцит, вызывает его размножение и созревание потомков, имеющих одинаковые антигенсвязывающие участки. Совокупность лимфоцитов, произошедших из одной активированной клетки и имеющих одинаковую антигенную специфичность, называют **клоном**.

Большинство чужеродных макромолекул (все белки и большая часть полисахаридов) могут служить антигенами. Участки антигена, которые взаимодействуют с антителом или рецептором Т-лимфоцита, называются *антигенными детерминантами*, или *эпитопами*. Если чужеродная молекула может присоединиться к антителу или рецептору, но не способна вызвать иммунный ответ, она называется *гаптеном*. Гаптены могут стать полноценными антигенами, если будут присоединены к макромолекуле или носителю. Различные эпитопы в разной степени индуцируют иммунитет; те из них, которые способны вызвать наиболее сильную реакцию, называются *иммунодоминантными*. Если антиген стимулирует выработку многих антител разными клонами В-клеток, то такой ответ называют *поликлональным*. Большинство антигенов вызывает поликлональные ответы. Ответ называют *олигоклональным*, если на антиген реагирует несколько клонов, и *моноклональным*, если реагируют клетки одного клона.

9.3. ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ПАМЯТЬ

После первичного однократного введения антигена наблюдается лаг-период продолжительностью в несколько дней, после которого появляется иммунный ответ, быстро усиливающийся, а затем плавно снижающийся. Такая реакция организма называется *первичным иммунным ответом*. Повторное введение того же антигена даже через длительный промежуток времени вызывает *вторичный иммунный ответ*. Он существенно отличается от первичного: короче лаг-период, силь-

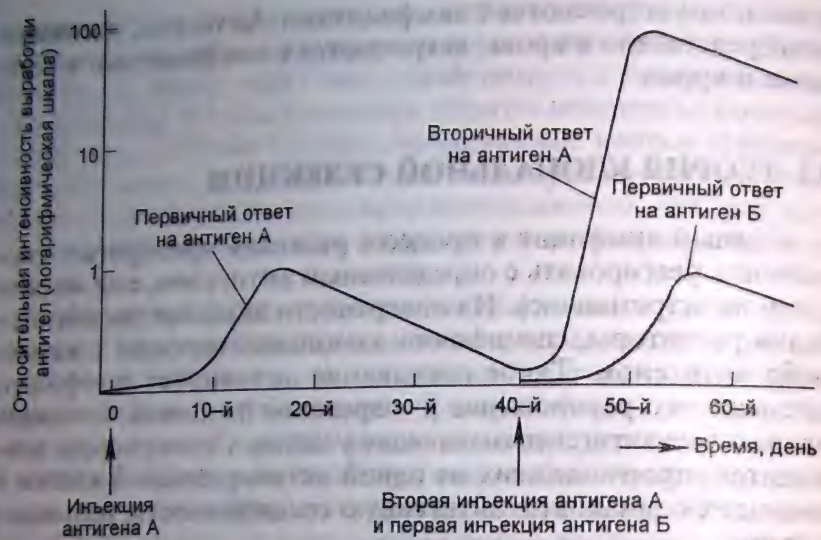


Рис. 9.2. Первичный и вторичный гуморальные ответы, вызванные первым и вторым введением антигена А.

нее и продолжительнее иммунная реакция (рис. 9.2). Следовательно, в организме осталась *специфическая иммунологическая память*.

Лимфоциты во вторичных лимфоидных органах находятся, по крайней мере, на трех стадиях созревания: *виргильные клетки, клетки памяти и активные клетки*. Виргильные лимфоциты — это дифференцированные клетки до встречи с антигеном. Когда виргильные лимфоциты впервые встречаются со специфическим антигеном, комплементарным рецептору клетки, они начинают размножаться и становятся активными клетками, которые участвуют в иммунной реакции. Другие виргильные клетки, размножаясь, становятся клетками памяти, которые сами не дают иммунного ответа, но при повторном взаимодействии с антигеном легко превращаются в активные клетки (рис. 9.3).

Виргильные клетки живут всего несколько дней, если не встретятся с антигеном. Клетки памяти могут жить много месяцев и даже лет без деления, постоянно циркулируя между кровью и лимфоидными органами. Для них характерна большая готовность отвечать на антиген, так как они имеют более высокое сродство рецепторов к антигену. Пролиферация активированного антигеном клона носит название экспансии клона. Отсутствие иммунного ответа на собственные макромолекулы организма обусловлено приобретенной иммунологической толерантностью.

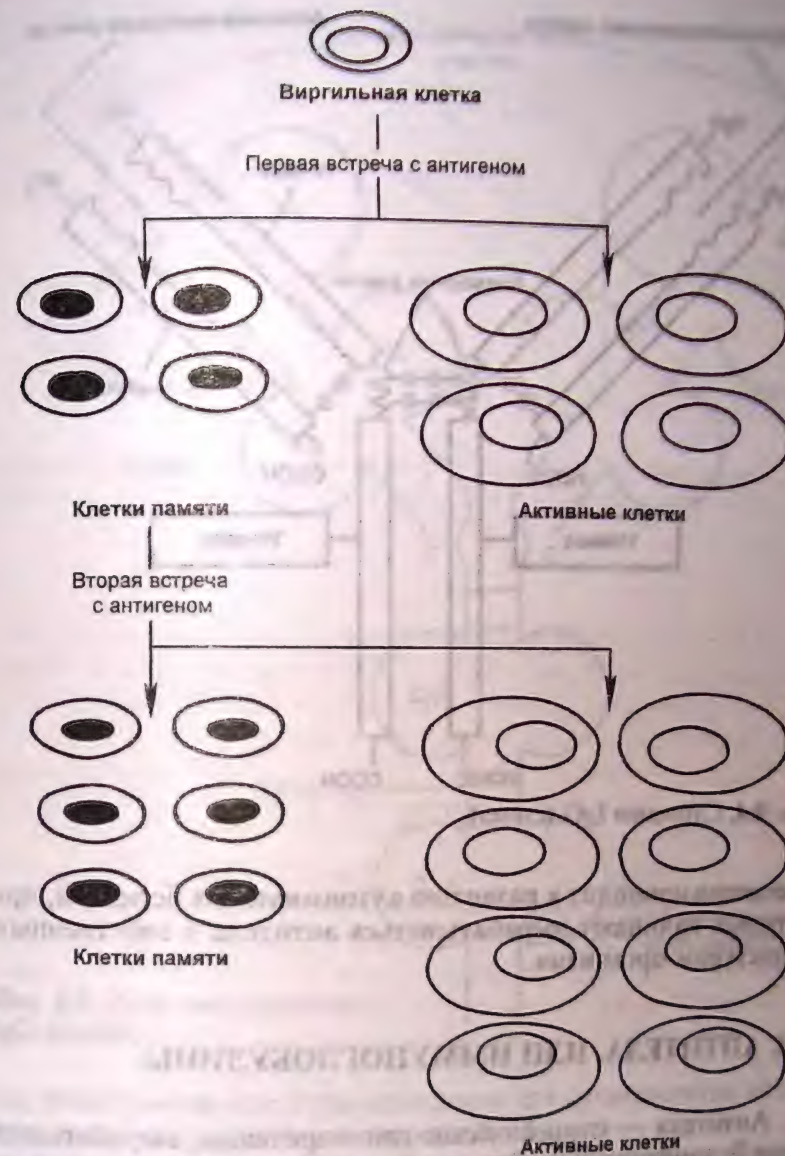


Рис. 9.3. Образование активных В- и Т-лимфоцитов и клеток памяти после первой и повторной встречи с одним антигеном (первичный и вторичный специфические иммунные ответы).

Иммунная система потенциально способна реагировать на «антигены» собственного организма, но «обучается» этого не делать. Процесс «обучения» включает элиминацию лимфоцитов, реагирующих на «свое». Такие лимфоциты вырабатываются в течение всей жизни человека, и требуется постоянное поддержание естественной толерантности. Нарушение этих

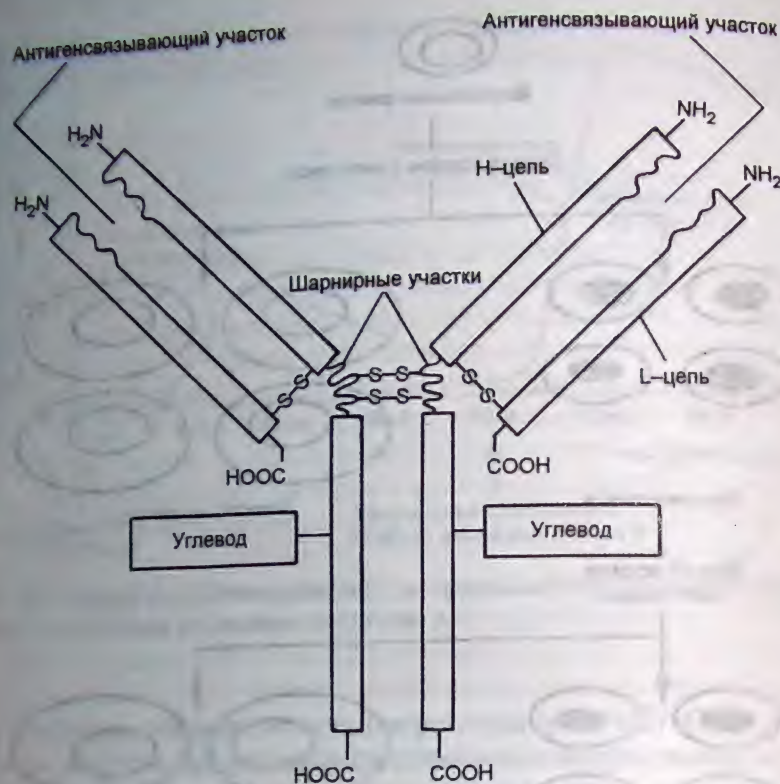


Рис. 9.4. Строение IgG (схема).

процессов приводит к развитию аутоиммунных болезней, при которых начинают вырабатываться антитела к собственным структурам организма.

9.4. АНТИТЕЛА, ИЛИ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ

Антитела — специфические гликопротеины, вырабатываемые В-лимфоцитами. Все молекулы антител, производимые одной В-клеткой, имеют одинаковые антигенсвязывающие участки. Первые антитела, синтезированные вновь образовавшейся клеткой, не секретируются, а встраиваются в плазматическую мембрану, где служат рецепторами для антигена. Каждая В-клетка имеет на поверхности примерно 10^5 таких молекул.

Когда антиген присоединяется к поверхности виргильной клетки, или В-клетки памяти, происходит пролиферация клетки и созревание в активную клетку, вырабатывающую антитела. Конечная стадия дифференцировки активного В-лимфоцита — плазматическая клетка, способная выделять антитела со скоростью 2000 молекул в секунду. Плазматические клет-

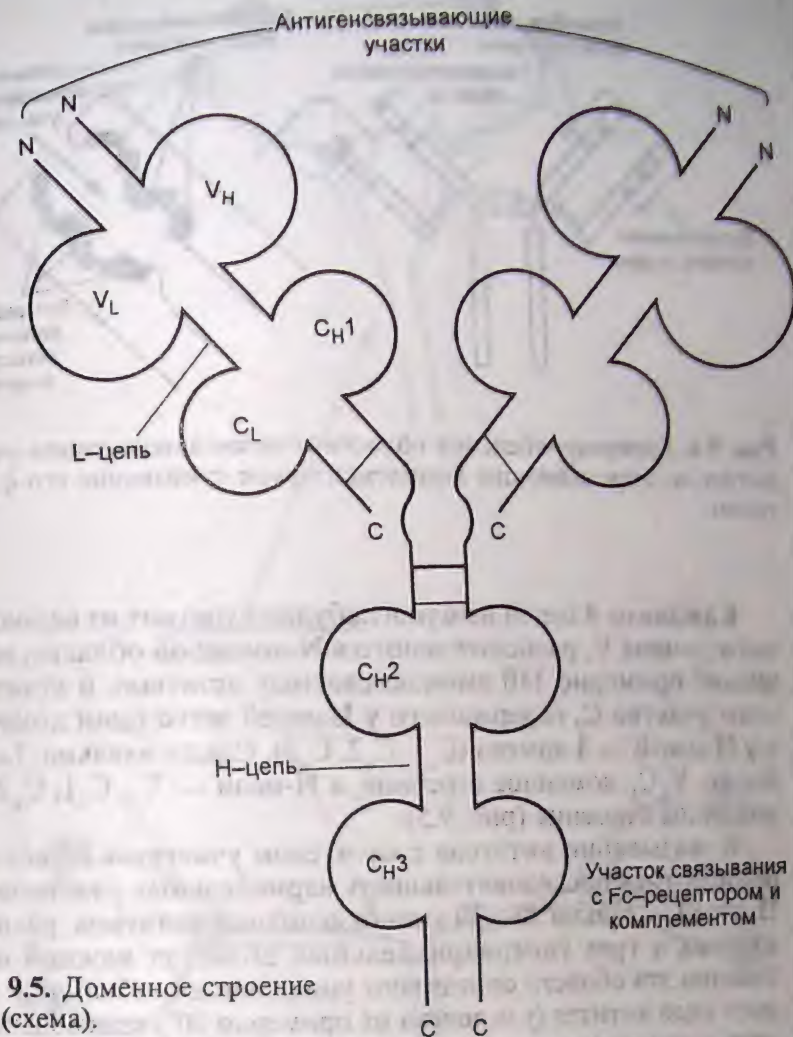


Рис. 9.5. Доменное строение IgG (схема).

ки, используя всю свою мощь для производства антител, погибают через несколько дней.

Строение антител. Простейшие молекулы антител имеют форму латинской буквы «Y» с двумя идентичными антигенсвязывающими участками, поэтому называются бивалентными. Молекулы антител состоят из четырех полипептидных цепей: две идентичные легкие (L-цепи, каждая состоит примерно из 220 аминокислот) и две тяжелые (H-цепи, каждая состоит из 440—700 аминокислотных остатков) (рис. 9.4). Все 4 цепи соединены множеством нековалентных и четырьмя ковалентными (дисульфидными) связями. Молекула антитела состоит как бы из двух идентичных половинок, содержащих одну легкую и одну тяжелую цепи, N-концевые участки которых формируют центр связывания с антигеном.

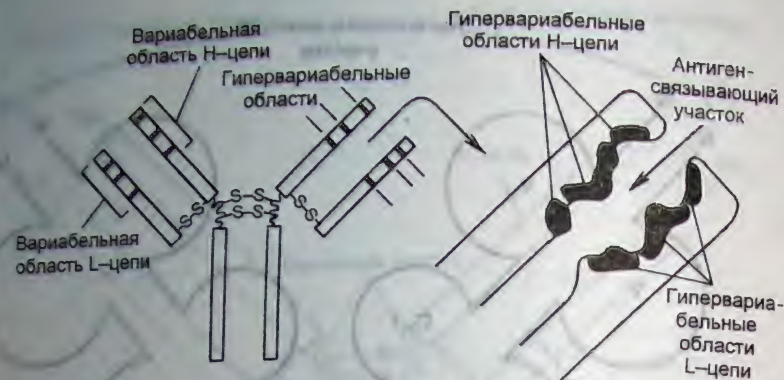


Рис. 9.6. Гиперварибельные области антигенсвязывающего участка антитела, определяющие комплементарное связывание его с антигеном.

Каждая из 4 цепей иммуноглобулина состоит из переменного домена V, расположенного в N-концевой области, содержащей примерно 110 аминокислотных остатков, и константного участка C, содержащего у L-цепей всего один домен C_L , а у H-цепей — 3 домена (C_H1 , C_H2 , C_H3). Следовательно, L-цепи имеют $V_L C_L$ доменное строение, а H-цепи — V_H, C_H1, C_H2, C_H3 доменное строение (рис. 9.5).

В связывании антигена с антителом участвует не вся аминокислотная последовательность переменных участков L- и H-цепей, а только 20—30 аминокислотных остатков, расположенных в трех гиперварибельных областях каждой цепи. Именно эти области определяют уникальные особенности каждого вида антител (у человека их примерно 10^7) взаимодействовать с соответствующим антигеном (рис. 9.6).

Между двумя константными доменами тяжелых цепей C_H1 и C_H2 расположен участок, содержащий большое количество остатков пролина, которые препятствуют формированию вторичной структуры и взаимодействию соседних H-цепей на этом отрезке. Он называется шарнирной областью и придает молекуле антитела гибкость и возможность вращения в этой области, что позволяет менять расстояние между двумя антигенсвязывающими участками и облегчает связывание антитела с антигеном (рис. 9.7).

Шарнирная область чувствительна к действию протеолитических ферментов. Так, папаин расщепляет молекулу антитела на 3 фрагмента: два идентичных Fab-фрагмента (fragment antigen binding) и один Fc-фрагмент (fragment crystallizable) (рис. 9.8). Fab-фрагмент содержит антиген, связывающий уча-

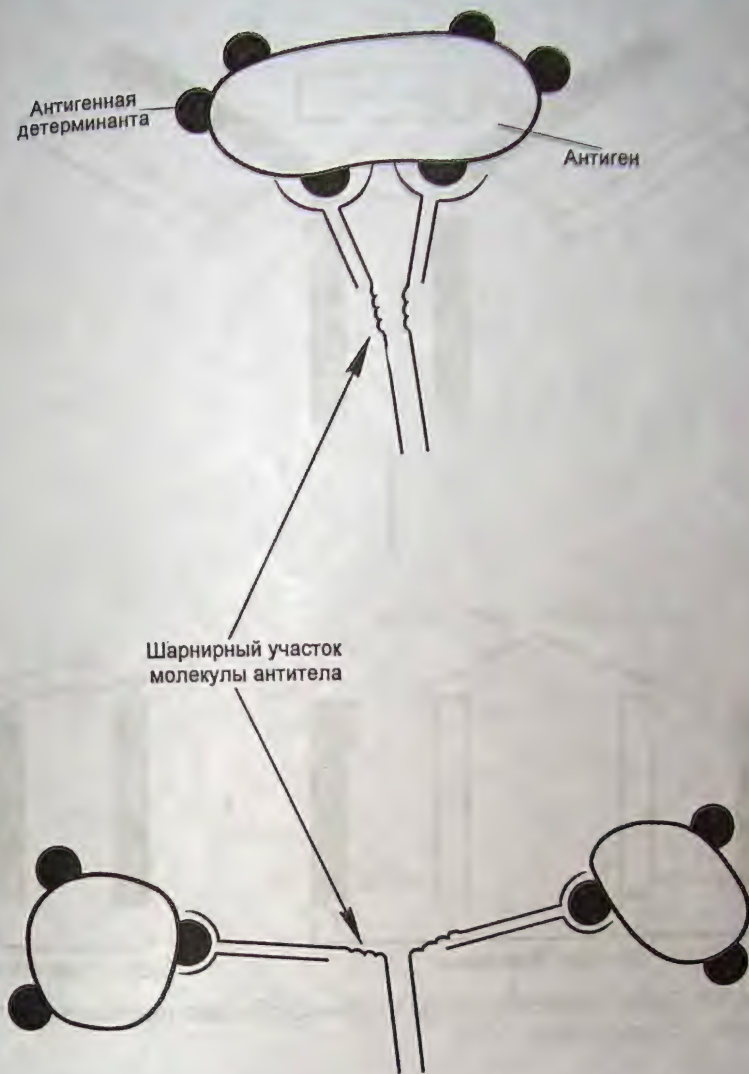


Рис. 9.7. Шарнирный участок молекулы антитела, повышающий эффективность связывания с антигеном.

сток, а Fc-фрагмент определяет дальнейшую судьбу образовавшегося комплекса антиген — антитело.

Классы антител. Существует 5 классов тяжелых цепей, отличающихся по строению не только переменных, но и константных доменов: α , δ , ϵ , γ , μ . В соответствии с ними различают 5 классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Некоторые классы (IgA и IgG) делятся на подклассы, например IgG ($IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4$), имеющие соответственно H-цепи: $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ и γ_4 . H-цепи придают шарнирным участкам и «хвостовым» Fc-областям антител различную конформацию и

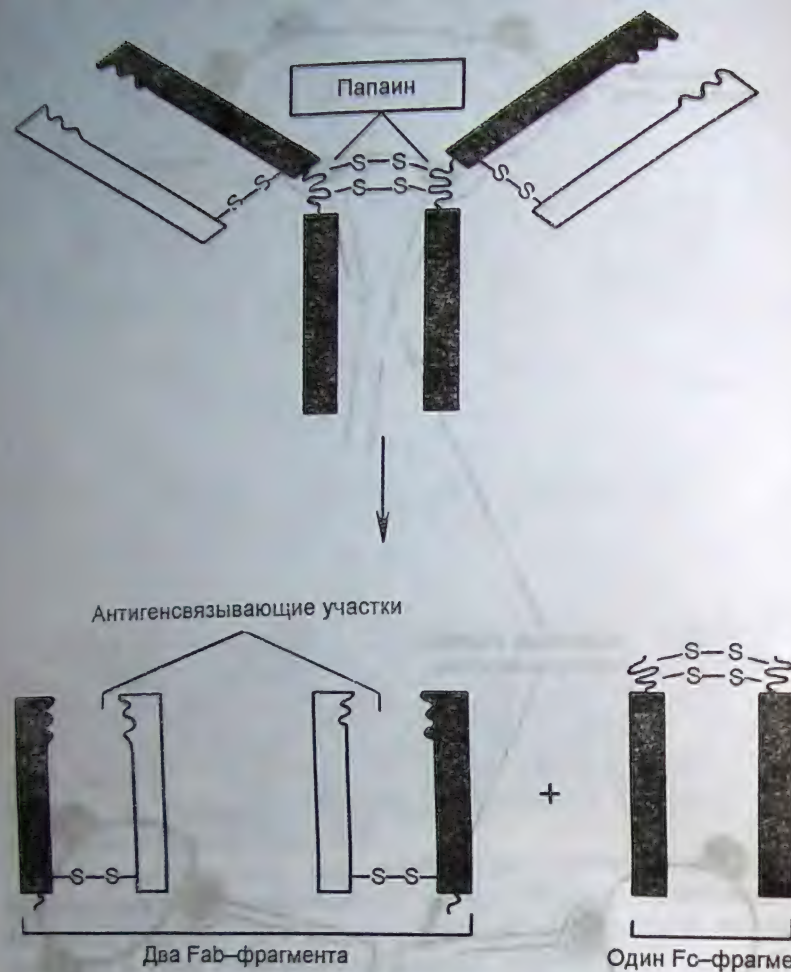


Рис. 9.8. Расщепление молекулы иммуноглобулина протеолитическим ферментом папаином.

определяют характерные свойства каждого класса. Кроме того, существует 2 класса легких цепей — ξ и λ . В молекуле антитела может присутствовать только один класс L-цепей.

IgM — первые антитела, продуцируемые развивающейся В-клеткой, хотя со временем многие В-клетки переключаются на выработку других классов антител. Вначале предшественник В-клетки, так называемая *пре-В-клетка*, вырабатывает только μ -цепи и накапливает их. Позднее начинают синтезироваться легкие цепи, которые, соединяясь с тяжелыми цепями, образуют 4-цепочечные IgM. Последние встраиваются в плазматическую мембрану. Таким образом, клетка приобретает поверхностные рецепторы, с помощью которых можно связать антиген. С этого момента ее называют виргильным В-лимфоцитом.

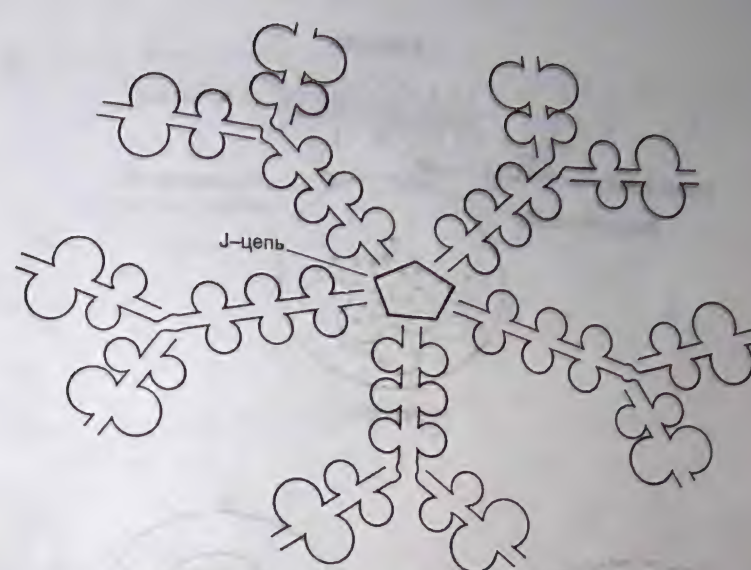


Рис. 9.9. Пентамерная молекула IgM.

Вскоре многие виргильные клетки начинают вырабатывать и поверхностные молекулы IgD, имеющие тот же антигенсвязывающий участок.

Кроме того, IgM — это основной класс антител, секретируемых в кровь на ранних стадиях иммунного ответа. Секретируемая форма состоит из пяти 4-цепочечных единиц; таким образом, каждый пентамер содержит 10 антигенсвязывающих участков (рис. 9.9). Присоединение антигена изменяет конформацию молекулы и индуцирует связывание C-концевых участков (Fc) с первым компонентом системы комплемента и его активацию. Если антиген расположен на поверхности микроорганизма, система комплемента вызывает нарушение целостности мембраны клетки и ее гибель.

IgD выполняет роль рецептора для антигена в плазматической мембране В-лимфоцита, другая его функция пока неизвестна.

IgG — основной класс иммуноглобулинов, локализуется в крови в период вторичного иммунного ответа, мономер. После взаимодействия IgG с поверхностными антигенами микроорганизмов Fc-область иммуноглобулина способна связывать и активировать систему комплемента, а также взаимодействовать со специфическими рецепторами макрофагов и нейтрофилов. Комплексы антиген — антитело фагоцитируются и уничтожаются в фагосомах этих клеток в результате активации ряда ферментов, генерирующих активные формы кисло-

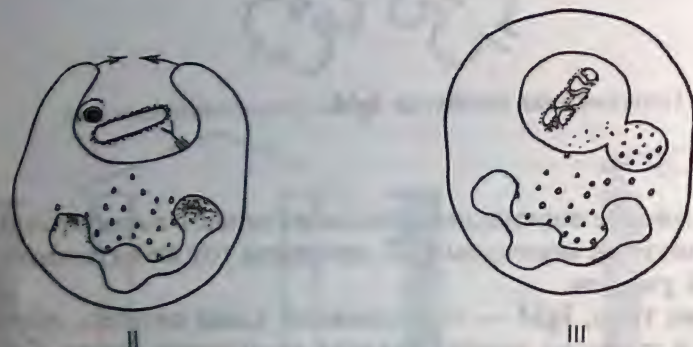


Рис. 9.10. Фагоцитоз нейтрофилом бактерии, покрытой антителами и белками комплемента.

I — бактерия, покрытая антителами и белками комплемента, присоединяется к нейтрофилу; II — псевдоподии окружают бактерию; III — переваривание бактерий внутри фагосомы.

рода, а также гидролитических ферментов, расщепляющих практически любые макромолекулы (рис. 9.10).

Кроме того, поскольку IgG — единственный класс иммуноглобулинов, способный проникать через плацентарный барьер, ему принадлежит главная роль в защите плода от инфекций как внутриутробно, так и в течение нескольких первых недель жизни. Поступающие в кишечник новорожденного с молоком матери IgG могут проходить через эпителиальные клетки в кровь и поддерживать пассивный специфический иммунитет.

IgA — основной класс антител в секретах (молоко, слюна, слезы, секреты дыхательных путей и пищеварительного тракта). Они выполняют функцию защиты слизистых оболочек от бактериального и вирусного инфицирования. Антитела этого класса связываются с микроорганизмами и препятствуют их присоеди-

нению к поверхности клетки. IgA представлены либо мономерами, либо димерами, соединенными J-цепью и цепью, называемой секреторным компонентом. В составе секретов обнаруживают димерную форму IgA (рис. 9.11). Транспорт антитела в секреты осуществляется путем транцитоза (рис. 9.12).

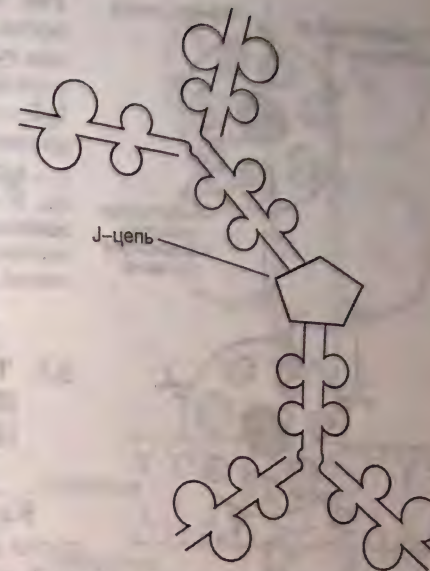


Рис. 9.11. Димерная молекула IgA.

IgE связываются с Fc-рецепторами на поверхности тучных клеток в тканях и базофилов в крови. Связанные молекулы IgE являются рецепторами для соответствующих антигенов. Присоединение антигена к этим клеткам приводит к выделению ими биологически активных веществ (гистамин, серотонин) (рис. 9.13). Они расширяют кровеносные сосуды, увеличивают проницаемость их стенок, начинается воспалительная реакция. Эти вещества в большой мере ответственны за проявления таких аллергических реакций, как сенная лихорадка, астма, крапивница.



Рис. 9.12. Транцитоз IgA через эпителиальные клетки в проток железы.

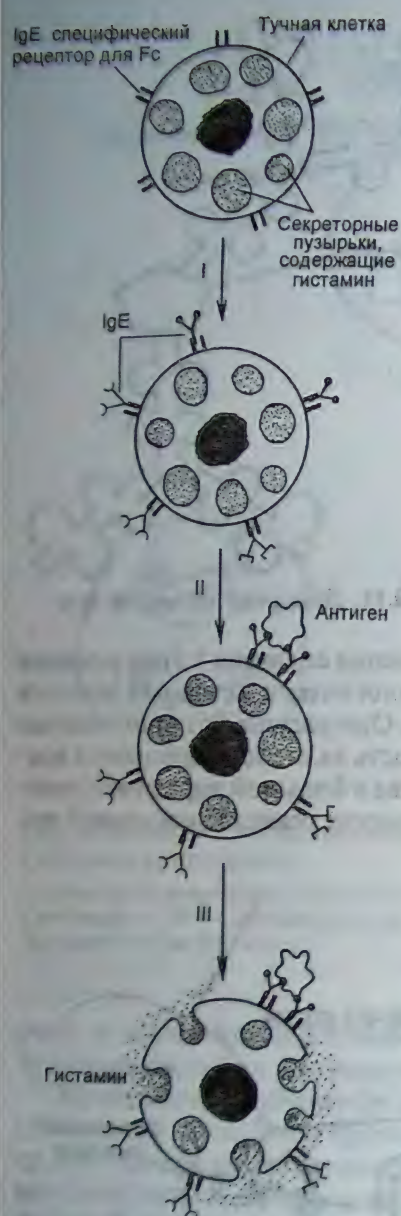


Рис. 9.13. Участие IgE в развитии воспалительной реакции. Активация тучной клетки или базофила в случае присоединения антигена к IgE, связанному с мембраной этих клеток.

I — IgE связывается с рецептором для Fc; II — мультивалентный антиген сшивает соседние молекулы IgE; III — гистамин высвобождается путем экзоцитоза.

9.5. Т-ЛИМФОЦИТЫ И КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ

Как отмечалось, Т-лимфоциты отвечают за специфический ответ клеточного типа. Одна из разновидностей Т-клеток — цитотоксические Т-лимфоциты, или Т-киллеры. Они способны распознавать и уничтожать больные клетки и клетки, зараженные бактериями, вирусами, грибами. Кроме того, регуляторные Т-лимфоциты — Т-хелперы и Т-супрессоры соответственно усиливают и подавляют реакции других клеток иммунной системы, причем Т-хелперы составляют 66 % от всех Т-лимфоцитов, а на долю Т-киллеров и Т-супрессоров приходится только 33 %.

На поверхности больных клеток организма появляются антигены, которые распознаются *специфическими рецепторами Т-лимфоцитов* только

тогда, когда этот антиген ассоциирован с особым классом гликопротеинов, находящихся на поверхности всех клеток, и кодируемым комплексом генов, называемым МНС (major histocompatibility complex).

9.5.1. РЕЦЕПТОРЫ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Рецепторы Т-лимфоцитов являются гетеродимерами, состоящими из гликозилированных α - и β -цепей (рис. 9.14).

Каждая цепь имеет два иммуноглобулиноподобных домена: V — переменный, находящийся на N-конце цепи и C-константный. C-концевой участок каждой цепи встроен в плазматическую мембрану. Антигенсвязывающий участок образуется между двумя переменными доменами — V_α и V_β . В отличие от рецепторов В-лимфоцитов и антител

Т-клеточный рецептор имеет только **один центр связывания с антигеном**. Существует огромное разнообразие рецепторов Т-лимфоцитов, сопоставимое с разнообразием антител.

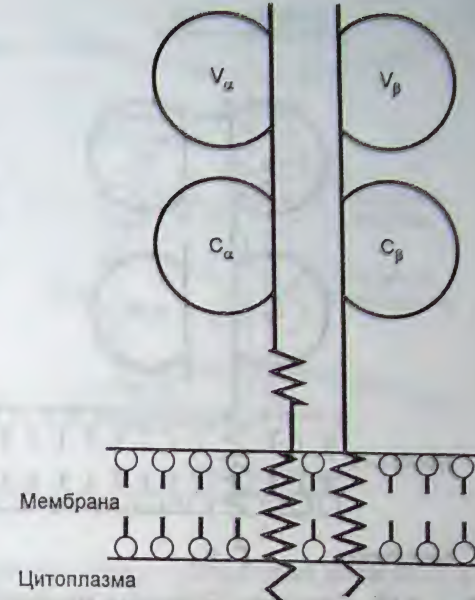


Рис. 9.14. Строение рецептора Т-лимфоцитов (схема).

9.5.2. БЕЛКИ КОМПЛЕКСА МНС

Как отмечалось, рецепторы Т-клеток узнают чужеродные антигены, например фрагменты вирусных белков, ассоциированные с молекулами МНС или HLA (human leukocyte associated), так как эти белки первоначально были обнаружены на лейкоцитах человека.

Существует два основных класса молекул МНС: класс I и класс II (рис. 9.15).

Молекулы МНС класса I являются гетеродимерами. Они имеют одну полипептидную α -цепь, связанную нековалентными связями с небольшим внеклеточным белком β_2 -микроглобулином (β_2m), который кодируется отдельным геном, находящимся в другой хромосоме. Полипептидная α -цепь имеет три внеклеточных глобулярных домена (α_1 , α_2 и α_3), трансмембранный участок и карбоксильный конец, локализованный в цитоплазме. Домены α_1 и α_2 содержат полиморфные участки,

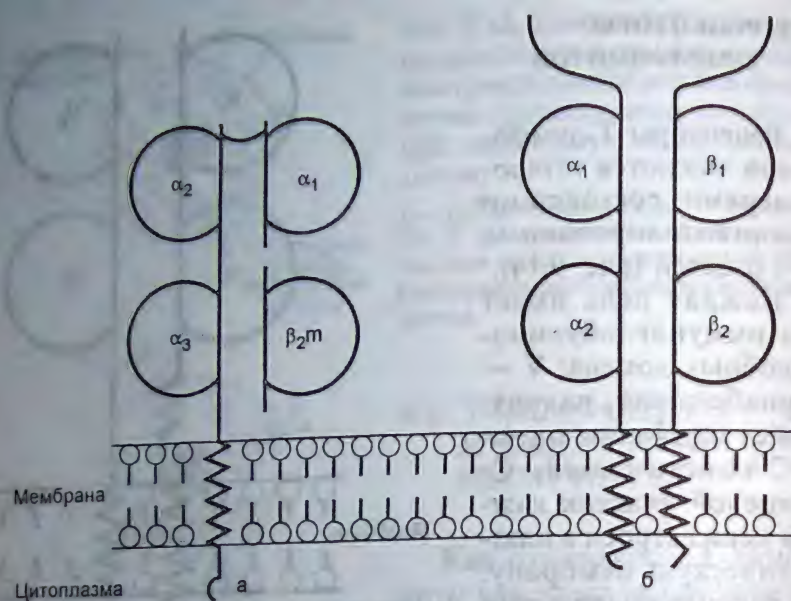


Рис. 9.15. Строение белковых молекул главного комплекса гистосовместимости — МНС класса I (а) и II (б) (схема).

между которыми находится область связывания антигена и представления его Т-лимфоцитам (рис. 9.15, а).

Молекулы МНС класса II также гетеродимеры. Они состоят из двух полипептидных цепей — α и β , имеющих по одному консервативному домену, сходному с таковым у иммуноглобулинов, и одному вариабельному домену на N-концевых участках. Центр связывания с чужеродным антигеном формируется за счет полиморфных участков вариабельных доменов α - и β -цепей (рис. 9.15, б).

В отличие от молекул МНС класса I, расположенных на поверхности практически всех клеток, молекулы МНС класса II имеются только на определенных клетках иммунной системы, называемых антигенпредставляющими клетками, к которым относятся макрофаги и В-лимфоциты, контактировавшие с антигеном. Т-клетки не узнают антигенные детерминанты в белке, имеющем третичную структуру, но узнают детерминанты развернутой полипептидной цепи.

Попавшие в клетку хозяина в результате эндо- или фагоцитоза чужеродные белки (например, белки вирусных частиц) в лизосомах подвергаются частичному протеолизу, и небольшие фрагменты этих белков вместе с белками МНС класса I или II экспонируются на поверхности клеточной мембраны (рис. 9.16).

Комплексы пептид — белки МНС узнаются рецепторами Т-лимфоцитов, в результате чего происходят их активация и

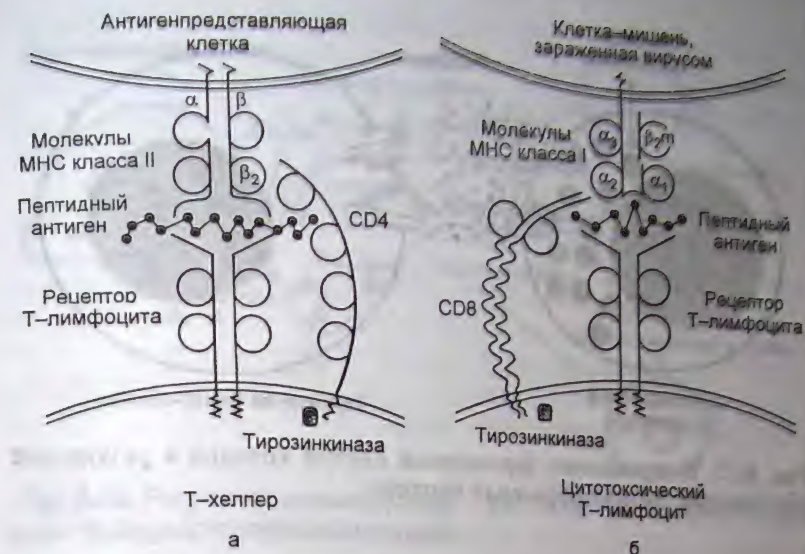


Рис. 9.16. Взаимодействие Т-лимфоцитов с чужеродным антигеном в комплексе с молекулами МНС класса I или II.

а — взаимодействие Т-хелпера с чужеродным пептидом на поверхности антигенпредставляющей клетки; б — взаимодействие цитотоксического Т-лимфоцита с клеткой, зараженной вирусом.

развитие специфической иммунной реакции. Вследствие огромного полиморфизма белков МНС такие молекулы другого организма воспринимаются Т-лимфоцитами как собственные белки МНС в комплексе с антигеном. Поэтому при трансплантации чужеродных клеток возникает мощная иммунная реакция, приводящая к отторжению и гибели трансплантата.

9.5.3. ДЕЙСТВИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ НА КЛЕТКИ, ЗАРАЖЕННЫЕ ВИРУСАМИ

На поверхности клеток хозяина, зараженных вирусами, находятся пептидные антигены, соединенные с белками МНС класса I. Цитотоксический Т-лимфоцит, имеющий рецептор, комплементарный этому комплексу, присоединяется к нему. Белок CD8, специфичный для Т-киллеров и Т-супрессоров, необходим для облегчения связывания рецептора Т-клетки с антигенным комплексом и усиления проведения сигнала в клетку, так как связан со специфической тирозинкиназой (см. рис. 9.16, б). В результате взаимодействия включаются механизмы, уничтожающие зараженную клетку. Одним из таких механизмов является высвобождение лимфоцитами порообра-

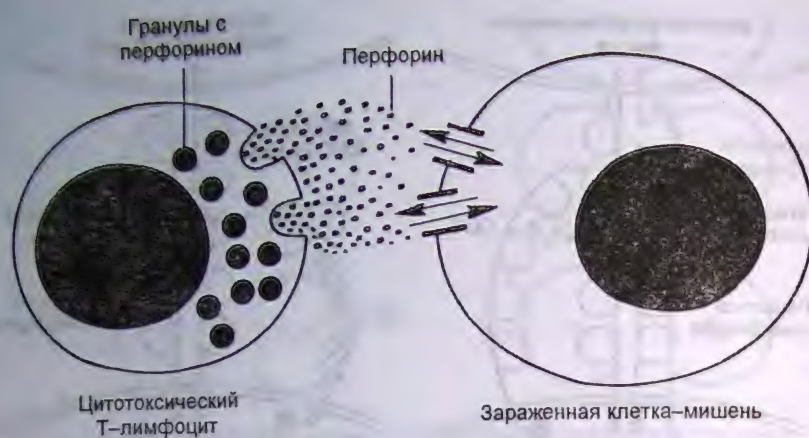


Рис. 9.17. Повреждение зараженной клетки хозяина в результате образования трансмембранных каналов.

зующих белков, называемых перфоридами. Они полимеризуются в плазматической мембране клеток-мишеней и образуют трансмембранные каналы, которые делают мембрану проницаемой, что и приводит клетку к гибели (рис. 9.17).

9.5.4. Т-ХЕЛПЕРЫ: ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И РОЛЬ В ИММУННОМ ОТВЕТЕ

Т-хелперы — специализированные Т-клетки, необходимые для усиления ответа на антиген большинству других клеток иммунной системы. Роль Т-хелперов наглядно проявляется при инфицировании вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Заболевание называют синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД). ВИЧ избирательно связывается со специфическим белком клеточной мембраны Т-хелперов CD4 и убивает эти клетки. В результате нарушается работа всей иммунной системы и организм такого человека становится восприимчив даже к тем микроорганизмам, которые редко инфицируют здоровых людей.

Различают, по крайней мере, 3 типа Т-хелперов:

- TH1 — участвуют в активации макрофагов и цитотоксических Т-лимфоцитов, продуцируют интерферон γ (ИФ- γ) и интерлейкин-2 (ИЛ-2);
- TH2 — активируют и вызывают созревание В-клеток, продуцируют интерлейкины 2, 4, 5, 6, 10;
- TH0 — смешанный тип, продуцирующий все перечисленные выше цитокины.

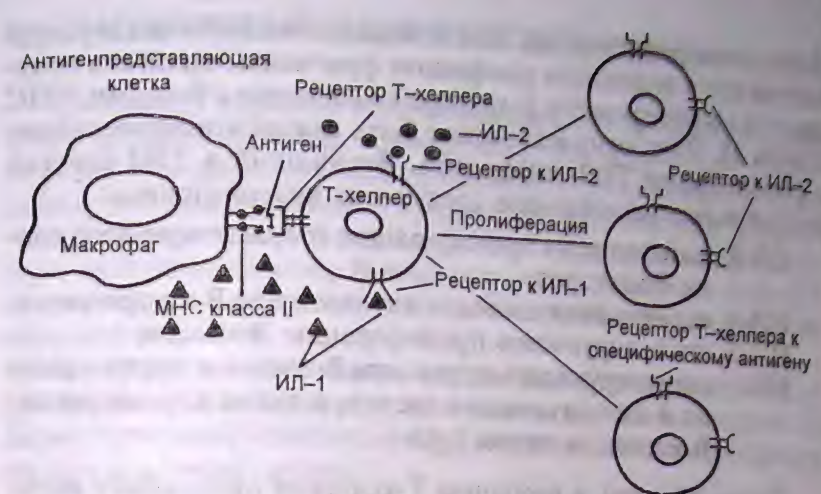


Рис. 9.18. Регуляция пролиферации Т-хелперов при взаимодействии с антигенпредставляющей клеткой.

Этапы активации иммунной системы под действием чужеродного антигена при участии Т-хелперов. Т-хелперы способны узнавать чужеродный антиген на поверхности антигенпредставляющих клеток в комплексе с молекулами МНС класса II (см. рис. 9.16, а).

Взаимодействие комплекса на поверхности макрофага со специфическими рецепторами TH1, в котором участвует также белок CD4 (его функции аналогичны функциям белка CD8 у цитотоксических Т-клеток), приводит к тому, что макрофаг начинает секретировать локальные медиаторы — цитокины, среди которых наиболее известен и изучен интерлейкин-1 (ИЛ-1). Действуя на рецепторы к ИЛ-1 на поверхности TH1 клеток, это вещество заставляет лимфоцит синтезировать и секретировать другой цитокин — интерлейкин-2 (ИЛ-2) и рецепторы к нему. Связывание ИЛ-2 с соответствующими рецепторами на поверхности Т-хелперов вызывает их пролиферацию (аутокринный механизм стимуляции) (рис. 9.18).

ИЛ-2, кроме того, может стимулировать пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов. Выделяемый лимфоцитами TH1 ИФ- γ увеличивает фагоцитарную и киллерную активность макрофагов, активирует цитотоксические Т-лимфоциты и участвует в переключении синтеза иммуноглобулинов — с IgG на IgE В-лимфоцитами, что важно для развития местной воспалительной реакции.

Регуляция синтеза антител Т-хелперами. В отличие от макрофагов В-лимфоцит может представлять на поверхности только специфические антигены, которые были узнаны специ-

фическими рецепторами. После эндоцитоза антигена и разрушения его в эндосомах лимфоцита фрагменты антигена появляются на поверхности Т-хелпера в комплексе с белками МНС класса II. Этот комплекс может быть связан комплементарно с рецепторами ТН2-лимфоцита. Возникший в ТН2-клетках сигнал вызывает секрецию следующих интерлейкинов:

- ИЛ-2, вызывающего пролиферацию соответствующего клонна Т-хелперов;
- ИЛ-4, являющегося главным активатором В-лимфоцитов;
- ИЛ-5, стимулирующего пролиферацию В-клеток;
- ИЛ-6, стимулирующего созревание В-клеток и превращение их в плазматические клетки, а также переключение В-клеток на синтез IgG.

Таким образом, с помощью Т-хелперов происходит активация и пролиферация только тех В-клеток, которые имели специфический контакт с антигеном, а в крови повышается количество соответствующих иммуноглобулинов. Окончание гуморального ответа на антиген связано со снижением концентрации антигена и прекращением стимуляции В- и Т-клеток. Кроме того, гипервариабельные участки иммуноглобулинов могут действовать как антигены, на которые вырабатываются антитела. Такие участки называются идиотопами. Выработка больших количеств антител с одинаковыми идиотопами приведет к выработке антител к ним, а затем и антител к антиидиотопическим антителам. Возникает «сеть» связывающих друг друга антител.

Кроме того, Т-супрессоры подавляют активность эффекторных клеток иммунной системы, видимо, контролируя Т-хелперы. Механизм действия Т-супрессоров не выяснен, но наиболее приемлемой моделью их действия является связывание рецепторами Т-супрессоров идиотопов рецепторов размножившихся Т-хелперов, что приводит к прекращению их пролиферации, а возможно, и к гибели апоптозом.

Следовательно, попавшие в организм человека чужеродные молекулы вызывают «возмущение» иммунной системы, как ее специфических, так и неспецифических механизмов, приводящих к уничтожению «чужого» и постепенному «затуханию» иммунной реакции. Узнавание «чужого», скорее всего, объясняется способностью организма уничтожать Т-клетки в тимусе (в первую очередь Т-хелперы), реагирующие на собственные макромолекулы. Возможно, связь между эпителиальными клетками тимуса и Т-лимфоцитами включает механизм программированной гибели клетки (апоптоз). Известно, что в тимусе погибает более 95 % Т-клеток, что обеспечивает защиту организма от развития аутоиммунных болезней.

9.6. ПАТОЛОГИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Сложность строения и многоуровневость функционирования иммунной системы, по-видимому, обуславливают разнообразие и обширность заболеваний, которые относят к патологии иммунной системы. Трудно представить себе болезнь человека, при которой в той или иной мере не была бы затронута иммунная система. В данном разделе рассмотрены болезни, в которых нарушения иммунной системы носят первичный, ведущий характер.

По выраженности иммунных реакций (количественная характеристика) и характеру иммунного ответа (качественная характеристика) болезни иммунной системы можно разделить на три основные группы:

- ▲ *иммунодефициты* — болезни, связанные с нарушением функционирования какого-либо компонента, но приводящие в конечном итоге к дисфункции всей иммунной системы;
- ▲ *реакции гиперчувствительности* — реакции повышенной чувствительности и реактивности в ответ на антигенную стимуляцию;
- ▲ *аутоиммунные болезни* — нарушение иммунологической толерантности по отношению к молекулам и клеткам организма, в результате чего включаются механизмы уничтожения собственных структур.

9.6.1. ИММУНОДЕФИЦИТЫ

Состояние иммунологической недостаточности может возникнуть в любом возрасте. Иммунодефициты, вызванные генетическими нарушениями в каком-либо звене иммунной системы, называют *первичными*, или *врожденными*, *иммунодефицитами*. Многие врожденные патологии иммунной системы вызывают тяжелые, не совместимые с жизнью состояния, которые наблюдают педиатры.

Вторичные, или *приобретенные*, *иммунодефициты* — это следствие ряда заболеваний, влияния физических и химических факторов окружающей среды, лекарственных средств и лечебных воздействий, голодания. Особую актуальность в настоящее время приобретает вторичный иммунодефицит, вызванный заражением человека ВИЧ (вирус иммунодефицита человека). Вирус уничтожает Т-хелперы и, таким образом, подавляет специфическую иммунную реакцию, в результате чего человек становится беззащитен, не может противостоять

не только патогенной, но и условно-патогенной инфекции, что в конечном итоге приводит к смерти.

Люди, страдающие иммунодефицитами, особенно подвержены инфекционным болезням, имеющим общие, характерные для всех иммунодефицитных состояний черты:

- эти болезни часто хронические или рецидивирующего характера;
- при использовании стандартной для данной нозологии терапии больные вылечиваются лишь частично;
- часто причиной болезни бывают не обычные, а так называемые оппортунистические микроорганизмы, обладающие низкой вирулентностью и неспособные вызывать заболевания в организме с нормально функционирующей иммунной системой.

С клинической точки зрения, более предпочтительна классификация, основанная на учете тех компонентов иммунной системы, в которых имеются следующие нарушения:

- ▲ *нарушения гуморального иммунитета*, связанные с нарушением синтеза антител, вызванных дисфункцией В-лимфоцитов;
- ▲ *нарушения клеточного иммунитета*, связанные с дисфункцией Т-лимфоцитов;
- ▲ *комбинированные иммунодефициты*, вызванные нарушением функционирования как В-, так и Т-лимфоцитов;
- ▲ *патология клеток миелоидного ряда* (нейтрофилы, макрофаги), приводящая к нарушению фагоцитоза;
- ▲ *нарушения в системе комплемента*.

Примером болезней 1-й группы служит врожденная агаммаглобулинемия Брутона — заболевание, сцепленное с Х-хромосомой и встречающееся только у мужчин. В лимфатических узлах таких больных обнаруживается лишь незначительное количество лимфоцитов и плазматических клеток. Мальчики болеют повторными инфекциями, вызванными гноеродными бактериями. У данных больных не нарушен клеточный иммунитет, поэтому такие вирусные инфекции, как корь или ветряная оспа, протекают у них без осложнений.

Болезни 2-й группы — это, например, синдромы Диджордже и Незелофа, вызванные недоразвитием тимуса из 3-го и 4-го глоточных мешков во время эмбриогенеза. В результате стволовые клетки не могут дифференцироваться в Т-лимфоциты и возникают нарушения реакций клеточного иммунитета. Такие больные совершенно беспомощны перед вирусными болезнями, хотя справляются с обычными бактериальными инфекциями. В крови больных обнаруживают антитела, но

гуморальный ответ ослаблен вследствие отсутствия Т-хелперов, стимулирующих работу В-клеток. Некоторые формы клеточного иммунодефицита сопровождаются повышением частоты развития опухолей, так как снижен или отсутствует иммунологический надзор за удалением переродившихся клеток.

Комбинированный иммунодефицит часто является следствием нарушения процесса дифференцировки общего стволового предшественника лимфоидных клеток, в результате чего не образуются ни В-лимфоциты, ни Т-лимфоциты и нарушаются как клеточные, так и гуморальные иммунные реакции. Восстановление нормального функционирования иммунной системы возможно только путем трансплантации гистосовместимого костного мозга, чаще всего от брата или сестры.

Хронический гранулематоз является примером патологии, вызванной нарушением фагоцитарной активности моноцитов и нейтрофилов. Это заболевание связано с дефектом лизосомального фермента цитохрома b_{245} , необходимого для генерации активных форм кислорода, с помощью которых разрушается фагоцитированный объект. В результате поглощенные фагоцитами бактерии не уничтожаются. Другие формы патологии фагоцитоза связаны с дефектами других ферментов, участвующих в образовании активных форм кислорода: миелопероксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и др. Синдром «ленивых лейкоцитов» обусловлен нарушением реакции лейкоцитов на хемотаксические стимулы.

Белки системы комплемента обладают несколькими биологическими функциями.

Облегчение адгезии микроорганизмов фагоцитами. Белок С3b может прикрепляться к углеводам мембраны микроорганизмов. Такие микробы легко фагоцитируются макрофагами и нейтрофилами, так как на их поверхности имеются рецепторы к С3b.

Образование биологически активных фрагментов. С3а и С5а — небольшие пептиды, образующиеся в процессе активации комплемента. Они могут вызывать активацию фагоцитов, усиливая в них образование активных форм кислорода и представляют собой «анафилатоксины» — вещества, которые способствуют выбросу медиаторов из тучных клеток и базофилов.

Образование мембраноатакующего комплекса. Этот комплекс формирует трансмембранный канал в клетке, через который внутрь клетки поступают ионы и вода и происходит лизис.

Система комплемента содержит протеолитические ферменты и может быть агрессивна по отношению к молекулам и клеткам организма. Поэтому существуют молекулы, ограничивающие ее активацию. К ним относятся фактор Н, легко

взаимодействующий с белком С3b, и фактор С1, инактивирующий этот комплекс.

Нарушение в системе комплемента может быть вызвано патологией белков, контролирующей работу этой системы, и белков самой системы комплемента. Например, наиболее частым дефектом синтеза компонентов контроля за работой системы комплемента является недостаточность фактора С1. Эта недостаточность проявляется развитием ангионевротического отека, связанного с избыточным образованием вазоактивных компонентов системы комплемента. Больные, как правило, гетерозиготны, но небольшого количества ингибитора недостаточно, чтобы сдерживать образование вазоактивных веществ.

Примером нарушений в самой системе комплемента является довольно редкая недостаточность образования С3-конвертазы — ключевого фермента системы комплемента. В результате болезни понижается способность к удалению комплексов антиген — антитело, и для таких больных характерна необычайно высокая частота синдромов красной волчанки, характеризующейся отложением иммунных комплексов в разных тканях организма.

9.6.2. РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Иногда повторный контакт организма с антигеном приводит к *избыточной стимуляции иммунного ответа*, что может вызвать серьезные повреждения тканей. Такие неадекватно избыточные реакции иммунной системы называются *реакциями гиперчувствительности*.

По механизму возникновения и клиническим проявлениям эти реакции делят на 5 типов. Реакции I, II, III и V типов обусловлены *взаимодействием антигена с гуморальными антителами*. Эти реакции принято относить к *реакциям немедленного типа*. Одни из них развиваются быстрее, чем другие, но обычно реакции проявляются не позднее 1—2 мес после попадания антигена в организм. Реакции гиперчувствительности IV типа связаны с *реакцией Т-лимфоцитов в ответ на специфический антиген*. Клеточная реакция развивается значительно медленнее, чем гуморальная (не ранее 2—3 мес после антигенной стимуляции), поэтому такую реакцию называют *реакцией замедленного типа*. Антигены, вызывающие в организме развитие реакции гиперчувствительности, называют *аллергенами*.

Реакции гиперчувствительности I типа (анафилактические). При иммунном ответе этого типа имеет место гиперсекреция медиаторов острого воспаления (серотонина, гистамина, лейкотриенов и др.), вырабатываемых тучными клетками и базо-

филами. Это вызывает резкое расширение сосудов, развитие отеков и снижение артериального давления, а также сужение просвета бронхов, приводящее к развитию симптомов бронхальной астмы.

Патогенез таких реакций выглядит следующим образом. Впервые попавший антиген стимулирует развитие первичной иммунной реакции. В организме начинают размножаться специфические для данного антигена В-лимфоциты, дающие начало клеткам памяти и плазматическим клеткам, вырабатывающим специфические антитела, в первую очередь IgM, затем IgG. Иногда усиливаются синтез и секреция специфических IgE, что, видимо, связано с особенностями иммунной системы индивидуума и строения антигена. IgE своими Fc-областями присоединяются с высоким сродством к рецепторам на поверхности тучных клеток и базофилов. В результате в организме появляются иммунные клетки, покрытые специфическими к данному антигену антителами. При вторичном попадании в организм данного антигена он начинает связываться со специфическими антигенсвязывающими участками IgE на поверхности базофилов и тучных клеток (см. рис. 9.13). Соединение одного антигена с двумя соседними антигенсвязывающими участками соседних IgE на поверхности клеток вызывает деформацию клеточной мембраны, активацию инозитол-3-фосфатного пути передачи сигнала, слияние плазматической мембраны и мембран внутриклеточных гранул. В результате происходят высвобождение биологически активных веществ (гистамин, серотонин и др.), а также активация синтеза метаболитов арахидоновой кислоты по циклооксигеназному и липооксигеназному путям (образование лейкотриенов, простагландинов и тромбоксанов), которые также являются мощными факторами развития острой воспалительной реакции.

Генерализованный выброс медиаторов приводит к развитию анафилактического шока за счет резкого падения артериального давления вследствие расширения сосудов и сужению просвета бронхов. Во многих случаях лишь своевременное введение адреналина позволяет предотвратить смертельный исход.

Местные анафилактические реакции развиваются в местах попадания и накопления аллергена в организме. Так, контакт аллергена с IgE, фиксированными на клетках бронхов, слизистой оболочки носа или конъюнктивы, приводит к локальному высвобождению медиаторов и вызывает симптомы астмы, сенной лихорадки или аллергического конъюнктивита соответственно.

При пищевой аллергии в пищеварительном тракте развиваются местные анафилактические реакции, что приводит к

рвоте и диарее, либо повышается проницаемость слизистой оболочки кишечника, что увеличивает всасывание аллергена. Проникший в кровоток аллерген образует комплексы с антителами, которые откладываются в таких тканях и органах, как кожа, суставы, бронхи. В результате возникают местные реакции: крапивница, приступ астмы, артрит. Существует ярко выраженная предрасположенность к таким реакциям, одним из факторов этой предрасположенности является повышенная способность синтезировать IgE.

Реакции гиперчувствительности II типа (гуморальные цитотоксические иммунные реакции). В крови могут появиться клетки, на поверхности которых имеются антигены. Связывание их с антителами запускает цитотоксический механизм, приводящий к гибели клеток, покрытых антителами. Повреждение мембраны вызывают активированные белки системы комплемента и NK-клетки. Кроме того, покрытые антителами клетки легко фагоцитируются макрофагами и нейтрофилами. Наиболее часто происходит разрушение мембран эритроцита, так как для его лизиса достаточно образования одного мембраноатакующего комплекса. Другие типы клеток имеют, по-видимому, механизмы репарации мембраны (что невозможно в эритроцитах, лишенных органелл), и для повреждения клеток необходимо одновременное возникновение нескольких мембраноатакующих комплексов.

Примерами реакции гиперчувствительности II типа служит гемолиз эритроцитов при переливании несовместимых групп крови. К наиболее важным мембранным антигенам эритроцитов относятся антигены системы ABO и Rh(резус)-антигены. Так, переливание крови, содержащей эритроциты с поверхностным антигеном, донору, его не содержащему, вызывает присоединение к поверхности «чужих» эритроцитов соответствующих антител и их разрушение.

Резус-несовместимость — еще одна важная антигенная система эритроцитов, которую важно учитывать при переливании крови. Кроме того, резус-несовместимость лежит в основе гемолитической болезни новорожденных. Мать, у которой отсутствует резус-антиген (резус-отрицательная), может быть sensibilizирована эритроцитами ребенка во время родов, если ребенок имеет резус-антиген. Образующиеся антитела в организме матери в основном относятся к IgG, которые легко проходят через плаценту. Поэтому повторные беременность и роды приводят к взаимодействию антител матери с эритроцитами плода и их массивному гемолизу.

Некоторые лекарственные средства, присоединяясь к поверхности эритроцитов или тромбоцитов в качестве гаптен, стимулируют выработку и присоединение к поверхности кле-

ток антител, что вызывает включение цитотоксических реакций (лекарственная непереносимость). Это приводит к развитию гемолитической анемии или тромбоцитопении.

Реакции гиперчувствительности III типа (образование иммунных комплексов). Реакции такого типа возникают в тех случаях, когда организм длительное время контактирует с избытком антигена. Это возможно при хронической инфекции (длительное присутствие микроорганизма), аутоиммунореактивности (реакция иммунной системы на компоненты собственного организма) или при частых повторяющихся контактах с внешним антигеном. В таких случаях взаимодействие антигенов с антителами приводит к образованию нерастворимых комплексов, которые откладываются в определенных тканях и вызывают в них воспаление. В этой области благодаря активации комплемента идет привлечение большого количества фагоцитов. В результате попытки фагоцитировать и разрушить комплексы лейкоциты и моноциты погибают, высвобождая содержащиеся в них протеолитические ферменты и активные формы кислорода, которые, в свою очередь, повреждают соседние здоровые клетки и ткани. Наибольшее повреждающее действие оказывают комплексы среднего размера.

При высоком уровне специфических антител преципитат образуется в месте проникновения антигена в организм. Примером может служить *астматический бронхит* сельскохозяйственных рабочих, вызываемый спорами грибов, живущих в заплесневелом сене. Сходная реакция возникает у голубеводов на белок, присутствующий в сухих экскрементах птиц.

Часто иммунные комплексы откладываются в местах сосудистых сплетений, где происходит фильтрация биологических жидкостей (например, в почках при образовании первичной мочи или в ЦНС при образовании цереброспинальной жидкости). Это приводит к развитию *гломерулонефрита* или *энцефалита* соответственно.

Реакции гиперчувствительности IV типа (опосредованные клетками). Эта форма гиперчувствительности часто наблюдается как реакция на бактерии, вирусы, грибы, а также при отторжении трансплантированных тканей. В отличие от других форм этот вид гиперчувствительности нельзя перенести от sensibilizированного организма к не sensibilizированному с помощью сывороточных антител. Основу этой реакции составляют узнавание Т-лимфоцитами антигенов на поверхности клеток в комплексе с белками МНС классов I и II и активация специфических Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов. В результате развивается реакция, приводящая к уничтожению действительно зараженных клеток организма или тех, которые Т-лимфоцитарная система распознает как «чужие»

(например, в случае отторжения трансплантата или аутоиммунных заболеваний).

Примерами повреждения тканей в результате развития реакций гиперчувствительности IV типа могут служить образование полостей в легких при туберкулезе (кавернозный некроз), кожный гранулематоз при некоторых формах проказы, кожная сыпь при кори и оспе, всевозможные кожные проявления при грибковых заболеваниях и т.д. Часто, если организму не удастся справиться с инфекцией, антиген вызывает хроническую локальную реакцию гиперчувствительности, которая проявляется в виде образования хронических гранул.

Реакции гиперчувствительности V типа (аутоенсибилизация, обусловленная антителами). На поверхности клеток имеются рецепторы, способные связываться с такими биологическими активными веществами, как гормоны, нейромедиаторы, лимфокины. Эти взаимодействия приводят к активации каких-либо внутриклеточных путей передачи сигнала и изменениям внутриклеточного метаболизма. У отдельных больных в крови обнаруживаются антитела к рецепторам некоторых биологически активных молекул. Такие антитела могут имитировать действие соответствующих веществ либо препятствовать связыванию этих веществ со своими рецепторами и ингибировать их действие. Наиболее яркий пример — развитие тиреотоксикоза у больных, в крови которых обнаружены антитела к поверхности тиреоидных клеток (болезнь Грейвса). Такие антитела, взаимодействуя с рецептором тиреотропного гормона, активируют аденилатциклазный механизм и усиливают синтез и секрецию тиреоидных гормонов.

9.6.3. АУТОИММУННЫЕ БОЛЕЗНИ

Чтобы иммунная система могла узнать и уничтожить любые существующие в природе чужеродные молекулы, синтезируется громадное разнообразие распознающих молекул, таких, как рецепторы лимфоцитов и антитела. Однако среди этого разнообразия должны образовываться молекулы, реагирующие и с собственными структурами организма. Поломка механизмов, обеспечивающих иммунологическую толерантность по отношению к аутоантигенам, приводит к включению иммунной защиты и разрушению собственных клеток. Развиваются аутоиммунные болезни, сопровождающиеся структурными и функциональными нарушениями определенных органов и тканей.

В настоящее время к аутоиммунным относят довольно много заболеваний, отдельные из которых приведены в табл. 9.1.

Аутоиммунные болезни и аутоантигены, к которым обнаружены антитела в сыворотке крови больных

Заболевание	Аутоантиген
Тиреоидит Хашимото	Тиреоглобулин
Первичная микседема	Коллоидный антиген
	Аутоантигены клеточной поверхности
Тиреотоксикоз	Поверхностные рецепторы для тиреотропного гормона
Пернициозная анемия	Внутренний фактор Кастла
	Микросомы обкладочных клеток желудка
Болезнь Аддисона	Цитоплазматические аутоантигены клеток коры надпочечников
Миастения	Аутоантигены скелетных и сердечной мышц
	Рецепторы ацетилхолина
Инсулинозависимый (ювенильный) сахарный диабет	Цитоплазматические аутоантигены β -клеток поджелудочной железы (глутаматдекарбоксилаза и др.)
	Аутоантигены клеточной поверхности β -клеток
Инсулинонезависимый сахарный диабет, тип В	Рецепторы инсулина
Аутоиммунная гемолитическая анемия	Эритроциты
Первичный билиарный цирроз	Митохондрии гепатоцитов
Ревматоидный артрит	IgG РНК
Дерматомиозит	Аутоантигены клеточных ядер
Склеродермия	ДНК
Системная красная волчанка	Нуклеопротеины IgG Растворимые цитоплазматические аутоантигены

Доказательством аутоиммунной природы болезней принято считать следующее:

- повышенные концентрации в крови аутоантител или аутоенсибилизированных Т-лимфоцитов;
- обнаружение и возможное выделение аутоантигена (см. табл. 9.1);

- возможность пассивного переноса патологического процесса в эксперименте с помощью аутоантител или сенсibilизированных Т-лимфоцитов.

Несмотря на огромное количество исследований, достоверных причин, вызывающих развитие той или иной аутоиммунной патологии, не установлено. Данные, полученные в ходе исследований, позволяют предполагать, что нарушения в способности иммунной системы распознавать «свое» и «чужое» могут быть связаны с появлением «новых» антигенных детерминант в организме; нарушениями в работе иммунной системы; полиморфизмом генов системы МНС; антигенной мимикрией (сходство чужеродных антигенов с аутоантигенами); комбинированными нарушениями.

Появление «новых» антигенных детерминант. Наглядным примером развития аутоиммунной болезни вследствие появления «новых» антигенных детерминант служит цитолитический кризис, глаукома, клеток мозга в результате повреждения тестикулярного или гематоэнцефалического барьера, так как благодаря высокой избирательной проницаемости барьеров клетки этих органов остаются «чужими» на протяжении всей жизни человека.

В ряде случаев длительный прием лекарственных средств может привести к присоединению лекарственных молекул к структурам клеток, их химической модификации и появлению аутоантигенов. Так, применение изониазида иногда вызывает артриты, сопровождающиеся образованием антиядерных антител, синтез которых продолжается и после отмены препарата.

У некоторых больных в результате применения пенициллинов развивается аутоиммунная миастения.

Предполагают, что новые аутоантигены могут появляться в ходе онтогенеза в результате нарушений синтеза каких-либо молекул под действием внешних или внутренних факторов, а также аномального их расщепления в лизосомах с появлением этих продуктов на поверхности клеток. Эти данные требуют экспериментального подтверждения.

Нарушения в работе иммунной системы. В литературе имеются данные о нарушении функций иммунной системы при некоторых аутоиммунных заболеваниях. Так, у больных системной красной волчанкой отмечены нарушения регуляции работы Т- и В-лимфоцитов:

- резко снижено количество неспецифических Т-супрессоров;
- снижено содержание специфических Т-лимфоцитов, подавляющих клеточную пролиферацию в ответ на действие митогена;

- В-лимфоциты больных продуцируют значительно больше иммуноглобулинов, чем В-лимфоциты здоровых.

У больных ревматоидным артритом обнаружены IgG с аномально гликозилированными углеводными цепями Fc-областей. В результате такие иммуноглобулины способны связываться друг с другом и образовывать иммунные комплексы, которые вызывают в суставах воспалительную реакцию.

Хорошо известно, что вероятность развития аутоиммунных болезней с возрастом увеличивается. Это связывают с инволюцией тимуса и снижением его способности удалять Т-лимфоциты, реагирующие с аутоантигенами.

В некоторых случаях отмечена неадекватная экспрессия белков МНС класса II на клетках, в норме их не содержащих. Так при аутоиммунном тиреоидите на поверхности клеток щитовидной железы обнаруживают значительное количество белков МНС класса II, хотя они не являются антигенпредставляющими клетками.

Полиморфизм белков МНС. К настоящему времени накопились многочисленные данные о связи некоторых аутоиммунных заболеваний с определенными антигенами МНС классов I и II. У человека высокополиморфную цепь α -молекул МНС класса I кодируют 3 генных локуса: HLA-A, HLA-B, HLA-C. Две цепи молекул МНС класса II кодируют также 3 локуса: HLA-DR, HLA-DP и HLA-DQ. Полиморфные варианты этих локусов обозначают цифрами.

Обнаружено, что лица, страдающие рассеянным склерозом, довольно часто имеют гены HLA-B7 (локус молекул МНС класса I) и HLA-DR2 (локус молекул МНС класса II). В настоящее время HLA-DR3 и HLA-DR4 рассматриваются как гены, определяющие предрасположенность к развитию инсулинзависимого сахарного диабета, а HLA-DR2 встречается у таких больных крайне редко. Особенно четкая корреляция с генами HLA обнаружена для анкилозирующего спондилоартрита (болезнь Бехтерева). Около 95 % больных содержат вариант HLA-B27, который часто встречается и при других формах артритов, вызываемых различной инфекцией.

Изучение распространенности различных полиморфных вариантов молекул МНС классов I и II и их комбинаций у людей с аутоиммунной патологией, выявление генотипов, наиболее склонных к развитию той или иной болезни, — это перспективные направления исследований, необходимых для прогнозирования развития болезни и ее ранней диагностики.

Антигенная мимикрия. Сложность распознавания иммунной системой «своего» и «чужого» заключается в том, что некоторые чужеродные молекулы по структуре бывают похожи

на молекулы организма. В результате иммунная система может вырабатывать антитела, которые перекрестно реагируют с чужеродными молекулами и собственными структурами. Это явление получило название антигенной мимикрии.

Так, в ходе эволюции многие микроорганизмы, приспособившись к выживанию в организме хозяина, приобретали поверхностные антигены, близкие по строению молекулам хозяина. В связи с этим иммунная система, вырабатывая специфические антитела к чужеродным антигенам, одновременно провоцирует и повреждение собственных клеток. Например, при ревматизме антитела, направленные против стрептококка, взаимодействуют и с нормальными антигенами сердечной мышцы, а антитела к нормальным антигенам слизистой оболочки толстой кишки при неспецифическом язвенном колите дают перекрестную реакцию и с *E.coli* 014. Известно также, что развитию инсулинзависимого сахарного диабета предшествует перенесенная ребенком вирусная инфекция, хотя в настоящее время специфический вирусный антиген, имитирующий аутоантигены β -клеток поджелудочной железы, не найден.

Давно и интенсивно изучаются причины развития аутоиммунных болезней, но до настоящего времени нет четких концепций. Можно с уверенностью сказать, что в основе развития этих болезней лежат комплексные причины. Важную роль в развитии аутоиммунных болезней, по-видимому, играют генетические факторы, определяющие особенности строения и функционирования иммунной системы и белков МНС, а также факторы окружающей среды, которые могут влиять на белковый состав клеток, заражение организма вирусами или бактериями и т.д. Детальное изучение этих аспектов развития аутоиммунных болезней позволит выявить контингент повышенного риска, построить систему профилактики таких болезней, а в случае их возникновения иметь возможность рано диагностировать и проводить комплексное лечение до развития тяжелых осложнений.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ

1. При хронических инфекционных заболеваниях пищеварительного тракта, дыхательных путей или мочеполовой системы в крови повышается количество поликлональных IgA. Почему при данных заболеваниях повышается синтез IgA? Каковы особенности строения и функционирования данного класса антител?

2. Какой класс иммуноглобулинов секретируется в кровь на ранних стадиях иммунного ответа? Какие особенности строения данных иммуноглобулинов обеспечивают эффективность связывания и уничтожения чужеродных клеток в этот период?

3. Какой класс иммуноглобулинов, присутствующий в молоке матери, обеспечивает защиту ребенка от желудочно-кишечных инфекций в течение первых месяцев его жизни?

4. Какой класс иммуноглобулинов и благодаря каким свойствам обеспечивает развивающемуся плоду и новорожденному в течение первых недель жизни антибактериальный иммунитет?

5. Усиленный синтез какого класса иммуноглобулинов вызывает предрасположенность к реакциям гиперчувствительности I типа? Почему эта реакция может развиваться даже при невысоких концентрациях данного класса иммуноглобулинов в крови?

6. Почему вакцинация предотвращает или значительно ослабляет развитие инфекционных заболеваний?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клиническая иммунология/Под ред. Е.И.Соколова. — М.: Медицина, 1998. — 217 с.
2. Ройт А. Основы иммунологии: Пер. с англ./Под ред. Р.Г.Василова. — М.: Мир, 1991. — 327 с.
3. Элементы патологической физиологии и биохимии/Под ред. И.П.Ашмарина. — М.: Изд-во МГУ, 1997. — С. 214—226.

4. Peakman M., Vergani D. Basic and Clinical Immunology. — New York, 1997.

10.1. ОКСИД АЗОТА: ОТ ОТКРЫТИЯ К КЛИНИКЕ

Прошло чуть более 10 лет после открытия оксида азота (NO) как важного регулятора тонуса сосудов. В настоящее время нет никаких сомнений относительно высокой значимости этого соединения для биологии и медицины. Открытие и изучение роли NO как высокоэффективного регулятора в сердечно-сосудистой системе было отмечено в 1998 г. Нобелевской премией в области физиологии и медицины. Лауреатами премии стали исследователи из США Роберт Фурчгот (Robert F. Furchgott), Ферид Мурад (Ferid Murad) и Льюис Игнаppo (Louis J. Ignarro).

Оксид азота — нетипичная сигнальная молекула. Это небольшое газообразное соединение, которое является свободным радикалом ($\text{N}=\text{O}$), имеет неспаренный электрон, что придает ему высокую реакционную способность. Радикал NO может реагировать в биологических системах с кислородом, супероксидным анион-радикалом ($\text{O}_2^{\cdot-}$) и ионами металлов переходной валентности. В связи с этим функциональный ответ клетки на действие NO многообразен и в значительной степени зависит не только от фенотипа клетки-мишени, а, что очень существенно, от количества NO в клетке, редокс-состояния самого NO и окружающих его молекул. Оксид азота хорошо растворим в воде и липидах, легко и быстро диффундирует через мембраны. Время жизни NO не превышает 6—10 с, после чего он превращается при участии кислорода и воды в нитраты и нитриты. Установлено, что молекулы NO синтезируются под действием фермента NO-синтазы (NOS) во многих клетках организма. Как аутокринная сигнальная молекула NO участвует в проведении сигнала от мембранных рецепторов к молекулам внутри клетки по гуанилатциклазному пути и другими способами. Как паракринный эффектор NO вносит вклад в согласованную работу близлежащих клеток, участвуя в образовании молекулярных сетей межклеточной сигнализации. Оксид азота отвечает за широкий диапазон функций: регуляцию тонуса сосудов, межклеточную коммуникацию, модуляцию нейротрансмиссии, регуляцию иммунной цитотоксичности, секрецию медиаторов и гормонов.

Оксид азота — потенциально токсичная молекула, которая широко используется организмом человека не только в разно-

образных физиологических, но и патологических процессах. Вероятно, не существует патологического процесса, в котором бы ни участвовало это соединение: гипертензия, сахарный диабет, сердечная недостаточность любой природы, рак, иарская импотенция, цирроз печени, заболевания почек, тромбозы и др. Действие NO на клетку может проявляться двойственным образом. Эта молекула может быть губительна для клеток, включая раковые, а также для внутриклеточных патогенных микроорганизмов.

Установлено, что цитотоксичность NO является результатом образования большого количества этих молекул и инициацией апоптоза. Двойственность действия NO проявляется в способности его защищать клетку от апоптозных сигналов и вызывать апоптоз. Будет ли молекула NO обладать цитостатическими функциями или проявится ее цитотоксичность, зависит от типа клетки, фазы ее развития, биохимического потенциала, локальной концентрации NO и других активных форм кислорода. Благодаря громадному интересу исследователей к этой молекуле получено много новых данных при изучении метаболизма NO в живой клетке, структуры NO-синтазы и установлено, что NO действует как важный регулятор таких общих клеточных процессов, как экспрессия генов и функция митохондрий. Эти исследования открывают новые возможности для синтеза более избирательно действующих лекарственных препаратов — ингибиторов NOS и NO-доноров. Последние используют в клинике еще с XIX в., с тех пор, как Томас Брантон (Thomas Brunton) доложил об использовании нитроглицерина при лечении стенокардии.

В данной работе суммированы новые данные о молекулярных основах биосинтеза и действия NO в органах и системах при физиологических и патологических состояниях, а также современные и будущие подходы в использовании NO в клинике.

10.2. БИОСИНТЕЗ ОКСИДА АЗОТА

Оксид азота образуется в результате окисления кислородом гуанидиновой группы L-аргинина при участии фермента NO-синтазы (NOS; рис. 10.1). Кроме NO, в реакции образуется L-цитруллин. Кислородные атомы как в NO, так и в L-цитруллине происходят из атмосферного кислорода. В процессе биосинтеза NO участвует 5 электронов. По своему механизму реакция подобна монооксидазной реакции с участием цитохрома P-450. В ходе реакции образуется промежуточный продукт

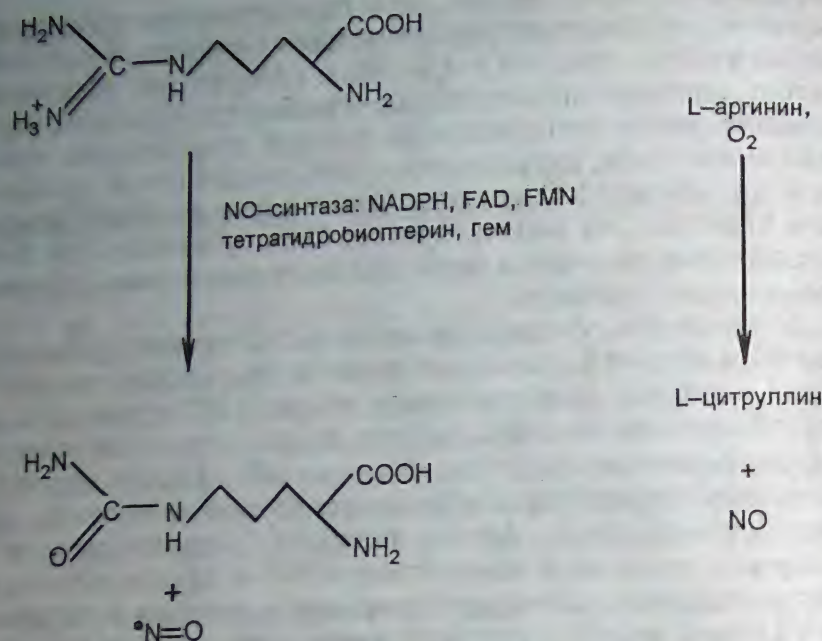


Рис. 10.1. Реакция, катализируемая NO-синтазой.

N-гидрокси-L-аргинин. Для активности NOS необходимы кальцийсвязывающий белок кальмодулин (CaM), а также коферменты и простетические группы: тетрагидроптерин (BH_4), NADP, FMN, FAD и гем. Таким образом, NOS — это биоптерофлавогемопrotein. В молекуле фермента выделяют 2 домена: оксигеназный (гемовый) домен на N-конце и редуктазный домен на C-конце (рис. 10.2).

Редуктазный домен включается в транспорт электронов от NADPH, а в оксигеназном домене находится центр для связывания аргинина и активации кислорода. Между доменами расположен участок для связывания CaM, без которого любая

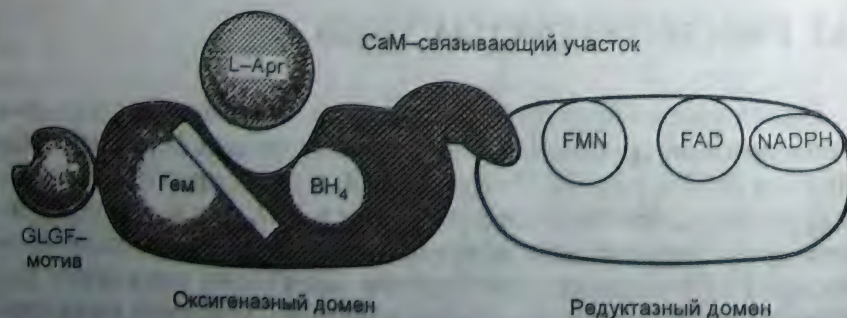


Рис. 10.2. Структурная организация нейрональной NOS (NOS-I).

форма фермента неактивна. В настоящее время накапливаются данные о том, что CaM непосредственно определяет субклеточную локализацию NOS. BH_4 необходим для формирования нативной структуры фермента. Как установлено при детальном изучении кристаллов фермента, BH_4 необходим для сближения кислорода, связанного с железом гема, и с гуанидиновой группой аргинина. Доказано, что NOS является металлопротеином, и связывание Zn^{2+} обязательно для образования димерной молекулы фермента. N-концевая последовательность фермента; Гли-Лей-Гли-Фен- (см. рис. 10.2, GLGF-мотив) участвует, по-видимому, в ассоциации с другими белками.

При активации фермента происходит перенос электронов от NADPH на FAD, далее на FMN, после чего происходят восстановление железа гема и связывание кислорода с Fe^{2+} . Активированный кислород участвует в окислении атома азота гуанидиновой группы L-аргинина. Реакция зависит от концентрации Ca^{2+} . Комплекс Ca^{2+} — CaM включен в контроль переноса электронов между флавиновыми простетическими группами и гемом в оксигеназном домене.

Семейство ферментов, ответственных за образование NO, обнаружено во всех тканях и клетках.

Некоторые ткани и клетки, экспрессирующие конститутивную и индуцибельную NO-синтазу

Конститутивная NOS (nNOS или eNOS)	Индукцибельная NOS (iNOS)
Сосудистые эндотелиальные клетки	Сосудистые эндотелиальные клетки
Мезангиальные клетки	Мезангиальные клетки
Миокард	Миокард
Эндокард	Эндокард
Мегакариоциты	Мегакариоциты
Нейроны	Остеобласты, глиальные клетки
Периферические нервы	Островковые клетки поджелудочной железы, сосудистые клетки гладкой мускулатуры, макрофаги (моноциты), эозинофилы, лимфоциты, фибробласты и др.
Надпочечная железа	
Респираторный эпителий	
Тромбоциты и др.	

Три изоформы NOS очищены, клонированы и охарактеризованы на молекулярном уровне. Две из них стационарные (конститутивные): нейрональная — nNOS (NOS I) и эндотелиальная — eNOS (NOS III). Обнаружена еще индуцибельная форма — iNOS (NOS II). Необходимо отметить, что любая ткань может содержать более чем одну форму NOS, принима-

ющих участие в образовании NO при различных физиологических состояниях. Охарактеризованы гены трех форм NOS. Они расположены в разных хромосомах и имеют следующие характеристики:

ген nNOS — 12-я хромосома, 150 000 пар нуклеотидов, 29 экзонов;
ген iNOS — 17-я хромосома, 37 000 пар нуклеотидов, 26 экзонов;
ген eNOS — 7-я хромосома, 22 000 пар нуклеотидов, 26 экзонов.

Конститутивные формы фермента (nNOS в нервной системе и eNOS в сосудистом эндотелии) поддерживают низкий стационарный уровень NO, который не превышает нескольких микромолей и необходим для нейротрансмиссии, поддержания электрической активности нервных клеток, что крайне существенно для сохранения долговременной памяти; для вазорелаксации, эрекции, агрегации тромбоцитов, секреции гормонов, регуляции почечной гемодинамики, электролитного баланса и для многих других физиологических процессов.

Индукцибельная форма фермента (iNOS) экспрессируется во многих клетках (макрофаги, клетки печени, гладкомышечные клетки и др.) после иммунологических стимулов и при воспалении, например под влиянием медиаторов этих процессов — цитокинов, а также при действии на клетку эндотоксинов. При участии iNOS высвобождается большое количество NO. Стационарный уровень NO в этих тканях достигает сотни микромолей и поддерживается в течение от нескольких часов до нескольких дней, что зависит от длительности стимула. Оксид азота диффундирует через мембраны и, действуя на близлежащие клетки-мишени, усиливает апоптоз, убивает патогенные микроорганизмы и координирует Т-клеточный иммунный ответ.

Установлено, что уровень генной экспрессии конститутивных форм nNOS и eNOS может повышаться, а iNOS может функционировать как конститутивная форма фермента.

Сравнение функционально важных последовательностей в различных изоформах NOS (рис. 10.3) показало, что для всех NO-синтаз консервативными являются участки взаимодействия с FMN, FAD и NADPH, участки связывания субстрата реакции — аргинина с остатком глутаминовой кислоты, гема и BH_4 с остатками цистеина. Имеется общий участок для связывания CaM. Все три изоформы NOS могут обратимо фосфорилироваться. Так, nNOS может фосфорилироваться cAMP-зависимой протеинкиназой, CaM-зависимой протеинкиназой, протеинкиназой C и cGMP-зависимой протеинкиназой. Фос-



Рис. 10.3. Функционально важные участки структуры NOS.

форилирование снижает активность фермента. Важным различием между изоформами NOS является то, что связывание CaM с nNOS и eNOS и соответственно активация фермента происходят лишь при повышении концентрации Ca^{2+} . Индуцибельная форма iNOS связана с CaM и активна при низких концентрациях Ca^{2+} . Есть и другие отличия: в eNOS на N-конце молекулы находится участок для ацилирования. Эндотелиальный фермент подвергается миристоилированию и пальмитоилированию, что влияет на его субклеточную локализацию и косвенно на активность фермента. Ацилирование жирными кислотами eNOS служит сигналом для кавеол (ямки на поверхности клеток) и для закоривания фермента на мембране. При этом образуется неактивный комплекс со структурным белком кавеол кавеолином I. При повышении концентрации кальция и активации CaM комплекс eNOS с кавеолином разрушается и фермент становится активным. Активация модулируется сигнальными путями с участием G-белков. В нейрональном ферменте (nNOS) на N-конце находится специфическая зона

(PDZ домен), которая участвует во взаимодействии фермента с белками постсинаптических мембран нейронов мозга (postsynaptic density proteins — PSD-95, PSD-93), в результате чего устанавливается связь между глутаматным рецептором и ферментом, синтезирующим NO.

Таким образом, существуют различия и в структуре разных NOS, и в специфических путях контроля их активности. Более того, даже такие общие пути регуляции для изоформ NOS, как активация pNOS и eNOS при повышении концентрации ионов Ca^{2+} в клетке, обратимая регуляция путем фосфорилирования, регуляция концентрацией кислорода, кофакторов и изменением скорости экспрессии соответствующих генов, могут иметь особенности в разных тканях, например, по причине разного соотношения в них изоформ фермента.

10.3 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ДЕЙСТВИЯ ОКСИДА АЗОТА

Оксид азота — необычная сигнальная молекула, так как свободно секретируется из клетки без участия переносчиков, быстро передвигается и проникает в соседние клетки, не связываясь с мембранными рецепторами. Внутриклеточные эффекты NO зависят от его редокс-состояния. С биологической точки зрения наиболее важными являются следующие редокс-формы: NO^\bullet и NO^+ , где валентность азота составляет 2+ и 3+ соответственно. Свободный радикал NO^\bullet в клетке быстро взаимодействует с молекулярным кислородом, супероксидным анион-радикалом и металлами гемсодержащих и негемовых белков (рис. 10.4). В результате в клетке образуются нитрозильные комплексы гемового и негемового железа, которые впервые в 1967 г. обнаружил А.Ф.Ванин с помощью метода электронного парамагнитного резонанса.

Непосредственно с SH-группами белков взаимодействует NO^+ , который образуется из NO^\bullet после восстановления или взаимодействия с металлами. В результате в клетке при достаточном количестве тиолов под влиянием NO происходят нитрозилирование и изменение активности металлсодержащих белков, а также белков, имеющих реактивные цистеины. Регуляция активности белков нитрозилированием — один из способов контроля функции этих белков в клетке. Молекулярные основы физиологических эффектов NO связаны главным образом с реакциями нитрозилирования белков.

В случае образования больших количеств NO последний под действием iNOS может реагировать с супероксидным анионом ($\text{O}_2^{\bullet-}$), образуя другую активную форму кислорода — пе-

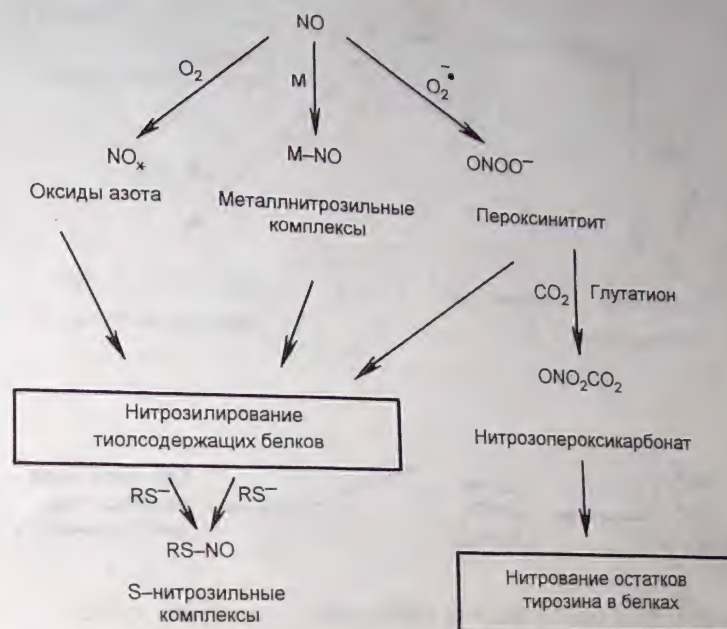


Рис. 10.4. Действие NO в клетке.

роксинитрит (ONOO^\bullet). Последний может вступать в реакцию восстановления с глутатионом и углекислым газом. В этом случае образуется нитропероксикарбонат (ONO_2CO_2), который может вызвать химическую модификацию реактивных остатков тирозина в белках, что сопровождается изменением их активности. Кроме этого, токсичный пероксинитрит может неэнзиматически продуцировать высокореакционноспособные гидроксильные радикалы (OH^\bullet), включая, таким образом, молекулу NO в образование новых активных форм кислорода (АФК) (рис. 10.5). Последние (OH^\bullet , NO^\bullet , ONOO^\bullet) могут окислять белки и липиды, разрушать DNA.

В последнее время установлено, что АФК могут быть также регуляторами апоптоза, включаясь в этот сложно регулируемый процесс на разных стадиях, в том числе на уровне изменений, происходящих в митохондриях. Все это может быть причиной ряда широко распространенных болезней: нейродегенеративных, сахарного диабета, атеросклероза, сердечной недостаточности, астмы, ускорения роста опухолей и др.

Итак, в основе широкого разнообразия NO-эффектов в клетке лежат изменение редокс-формы молекулы NO, а также дополнительные реакции с металлами, тиолами и остатком тирозина в составе белков. Увеличение количества АФК в клетке может трансформировать эффекты NO из защитных в

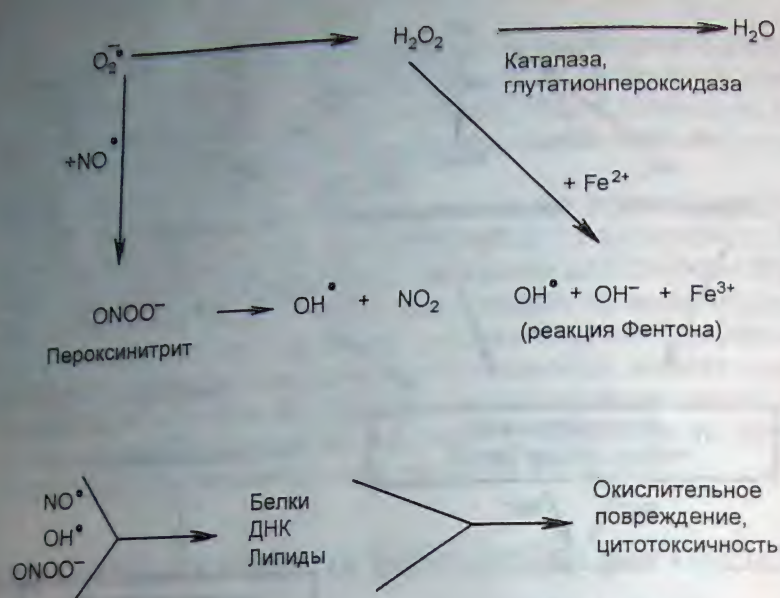


Рис. 10.5. Реакции с участием супероксидного аниона и NO.

цитотоксические. Последние могут возникнуть не только при индукции iNOS эндотоксинами и цитокинами, но и при истощении в клетке резерва тиолов и увеличении концентрации АФК, что приводит к уменьшению скорости нитрозилирования белков.

10.4. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ОКСИДА АЗОТА И ПУТИ ПРОВЕДЕНИЯ СИГНАЛА

Реакции нитрозилирования белков интенсивно изучаются. Известно много белков, активность которых изменяется после взаимодействия активных форм NO с металлами, тиолами и остатками тирозина этих белков (табл. 10.1). Активность белков может при этом как увеличиваться (например, гуанилатциклазы, циклооксигеназы, общего транскрипционного фактора NF-κB, кальцийзависимых K⁺-каналов), так и уменьшаться [например, ферментов гликолиза: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPD) и альдолазы цепи переноса электронов, протеинкиназы C]. Среди белков-мишеней для NO есть мембранные рецепторы, ионные насосы, сократительные белки (актин), ферменты и белки, участвующие в проведении сигналов (протеинкиназа C, RAS-белки, транскрипционные факторы).

Показано, что активация транскрипционных факторов под влиянием NO увеличивает экспрессию следующих белков: бел-

Таблица 10.1

Молекулярные мишени для NO

Реактивные участки	Локализация			
	мембрана	цитоплазма	ядро	вне клетки
Тиолы	NMDA-рецептор* K ⁺ -катионный канал RAS-белки*** Протеинкиназа C	GAPD Альдолаза Тканевый активатор плазминогена Актин Каспазы****	AP-1** NF-κB**	Глутатион Альбумин
Металлы	Гуанилатциклаза Гемоглобин NADH-убихинон-оксидоредуктаза (комплекс I) Цитохромоксидаза (комплекс II) Циклооксигеназа			
Остатки тирозина	Рибонуклеозидредуктаза			

* Глутаматный рецептор.

** Транскрипционные факторы.

*** «Маленькие» GTP-связывающие белки, участвующие в проведении сигналов.

**** Специфические цистеиновые протеазы, расщепляющие белки после аспарагиновой кислоты.

ков теплового шока (Hsp-70), белков антиокислительной защиты (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза), ферритина, рецепторов трансферрина, ядерного белка p53, ответственного за блокаду злокачественных новообразований. Оксид азота изменяет экспрессию семейства белков Bcl-2 — регуляторов апоптоза.

Одной из основных белковых мишеней для NO является гуанилатциклаза. В связи с этим выделяют cGMP-зависимый путь проведения сигнала NO и другие пути, которые не связаны с изменением количества cGMP в клетке. Взаимосвязь сигнальных путей в клетке, их сочетание, фенотипические особенности клетки делают эту классификацию весьма условной.

Гуанилатциклаза — это фермент, который катализирует реакцию образования важного вторичного посредника cGMP,

Механизм действия cGMP

Молекулярные мишени для cGMP	Тип клеточного ответа	Примеры
Ионные каналы	Изменение проницаемости	Фоторецепторные клетки: открываются катионные каналы Почки: ингибируется Na^+ -катионный канал
cGMP-зависимые протеинкиназы	Фосфорилирование	Медленные нейроны: увеличивается поток ионов Ca^{2+} в нейрон Гладкомышечные клетки: снижается $[\text{Ca}^{2+}]$ Тромбоциты: снижается $[\text{Ca}^{2+}]$
cGMP-стимулируемая фосфодиэстераза	Снижение $[\text{cAMP}]$	Сердце: уменьшается поток ионов Ca^{2+} в миоцит Гиппокамп: уменьшается поток ионов Ca^{2+} (долговременное потенцирование постсинаптического ответа, формирование памяти)
cGMP-ингибируемая фосфодиэстераза	Увеличение $[\text{cAMP}]$	Гладкомышечные клетки: снижается $[\text{Ca}^{2+}]$ Тромбоциты: снижается $[\text{Ca}^{2+}]$

регулирующего физиологические процессы во многих клетках организма, в том числе в сердечно-сосудистой системе.

Гуанилатциклаза является гемопротеином, состоит из двух разных субъединиц, каждая из которых необходима для проявления активности. Фермент активируется NO, свободными радикалами и окислителями. Активация гуанилатциклазы под действием NO происходит в результате конформационных изменений, вызванных образованием железонитрозильного комплекса. В клетке при этом возрастает количество cGMP, действие которого опосредуется cGMP-зависимыми протеинкиназами и cGMP-зависимыми фосфодиэстеразами (табл. 10.2). Через эти ферменты cGMP влияет на работу ионных насосов, скорость фосфорилирования белков. cGMP регулирует функцию сократительных белков, ионных насосов, регуляторных белков, участвующих в проведении сигнала, секреции медиаторов, регуляции транскрипции, трансляции и в регуляции функции митохондрий. Через cGMP-зависимые фосфодиэстеразы регулируется концентрация cAMP. Эти изменения проявляются в специфическом функциональном ответе клет-

ки на действие NO. Например, эндогенно продуцируемый в кардиомиоцитах и других клетках миокарда NO может непосредственно регулировать сократительную функцию миокарда.

Белки-мишени для cGMP-зависимых протеинкиназ изучены недостаточно, однако известно, что при повышении концентрации Ca^{2+} в клетке и последующей активации конститутивных форм NOS активируются АТФазы, снижается активность фосфолипазы С и протеинкиназы С. При действии NO на гладкие мышечные клетки увеличивается поток Ca^{2+} из клетки, уменьшается фосфорилирование под действием протеинкиназы С — киназы легких цепей миозина, которая становится неактивной. Это лишь один из NO-сигнальных путей, который приводит к нарушению важнейшего молекулярного события, запускающего мышечное сокращение, взаимодействия миозина, актина и АТФ. В итоге происходит мышечная релаксация.

Необходимо отметить, что регуляция одного и того же белка NO может происходить и по cGMP-зависимому пути, и по другим cGMP-независимым механизмам. Это зависит, как отмечалось, от концентрации NO и его окружения (например, активных форм кислорода), а также от присутствия или отсутствия других регуляторных сигналов. Например, NO ингибирует активность протеаз, участвующих в апоптозе, — каспаз по cGMP-зависимому пути и по независимому от cGMP механизму, а именно путем увеличения скорости S-нитрозилирования реактивных остатков цистеина. Это один из способов защиты клетки от апоптозных сигналов, в котором участвует NO. Однако при высокой концентрации NO происходит нитрование остатков тирозина в каспазах, что приводит к активации апоптоза и гибели клетки.

Другой пример: при нитрозилировании гема цитохромоксидазы регулируется скорость дыхания и синтеза АТФ. Однако при высокой концентрации NO происходит S-нитрозилирование критических тиолов в NADH-убихинон-оксидоредуктазе, что приводит к ингибированию дыхания, накоплению АФК, выходу из митохондрий цитохрома с и проапоптотических белков, активации каспаз и апоптозу.

10.5. ВКЛЮЧЕНИЕ ОКСИДА АЗОТА В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ОРГАНОВ И СИСТЕМ

Оксид азота генерируется многими клетками организма и, действуя на соседние клетки, вносит вклад в формирование сложной молекулярной сети межклеточной сигнализации. На рис. 10.6. представлена схема, на которой изображена систе-



Рис. 10.6. Схема молекулярных сетей генераторов и мишеней NO.

ма взаимодействия клеток сосудистой стенки с клетками органов дыхательной системы, кишечника, почек и, возможно, других систем. Клетки, выделяющие NO, показаны на рисунке более темными (эндотелиальные, астроцит, нейрон, эпителий, тучные клетки). В сосудистой стенке одна из основных функций NO, образующегося в эндотелиальных клетках, — релаксация гладких мышечных клеток сосудов.

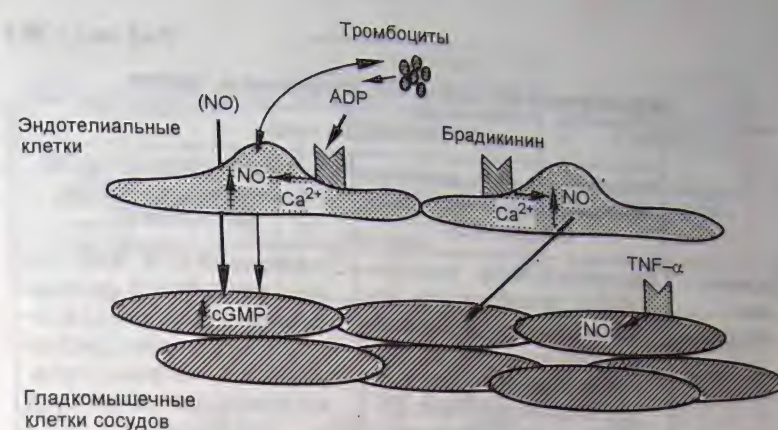


Рис. 10.7. NO-сигнальный путь в клетках сосудов.

Вместе с другими медиаторами NO включается в процесс ингибирования адгезии и агрегации тромбоцитов и адгезии лейкоцитов. Однако другие клеточные источники NO, такие, как адвентициальные клетки нервных волокон, нейроны, эпителиальные и интерстициальные клетки, также участвуют в регуляции функции гладкомышечных клеток органов и систем: легких (бронходилатация, регуляция вентиляции — перфузии), почек (регуляция реабсорбции натрия клетками macula densa, клубочковая капиллярная ультрафильтрация), кишечника (перистальтика). Некоторые из многочисленных процессов в органах и системах, в которые включается NO, в том случае, когда NO является посредником в передаче сигнала, представлены в табл. 10.3 (левая графа). За физиологические эффекты NO отвечают конститутивные изоформы NOS, кратковременно выделяющие NO под влиянием соответствующих сигналов (ацетилхолин, брадикинин, гистамин, глутамат и др.). Оксид азота быстро диффундирует в соседние клетки, например из эндотелиальных в гладкомышечные клетки сосудов (рис. 10.7).

Действуя по cGMP-зависимому сигнальному пути, NO уменьшает количество внутриклеточного кальция, что вызывает расслабление гладких мышечных клеток и вазодилатацию. По другим cGMP-независимым механизмам NO может активировать Ca^{2+} -зависимый K^{+} -насос в поверхностной мембране, что ведет к ее гиперполяризации. Этот механизм лежит в основе расширения сосудов, вызываемого увеличением тока крови и механическими (пульсовыми и др.) напряжениями сосудистой стенки. Последнее может иметь существенное значение для регуляции кровообращения в органах, соприкасающихся с клетками сосудистой стенки.

Двойственные функции NO: посредник и токсин

Ткань	Функции в клетке	
	NO-посредник (стационарная концентрация — несколько микромолей)	NO-токсин (стационарная концентрация — сотни микромолей)
Кровеносные сосуды	Вазорелаксация, дезагрегация тромбоцитов, антисклеротическое ингибирование миграции гладких мышечных клеток и пролиферации, антиадгезивные свойства	Септический шок, воспаление, реперфузия (расширение) очага повреждения, микрососудистые разрывы, атеросклероз, артериальная гипертензия
Сердце	Коронарное кровообращение, миотропное действие	Септический шок, сердечная недостаточность
Легкие	Вентиляция — перфузия, регуляция сокращения бронхов, секреция слизи, иммунная защита	Астма (обратимая обструкция легочных путей), повышенная чувствительность к различным стимулам
Почки	Клубочковая ультрафильтрация, антимикробное действие	Диабетическая гиперфильтрация, почечная недостаточность, гломерулярный склероз
ЦНС	Синаптогенезис, нейропластичность, формирование памяти, регулятор мозгового кровообращения, нейроэндокринная секреция, зрительная трансдукция, обоняние	Нейротоксичность, мигрень, судорожный синдром, гипералгезия (увеличение болевой чувствительности)
Поджелудочная железа	Секреция гормонов	Разрушение β -клеток
Печень	Регулятор метаболизма, дыхания, обезвреживания веществ, перфузия гепатоцитов, антимикробное действие, защита при дисфункции и воспалении	Реперфузия повреждения, гепатит, цирроз, септический и геморрагический шок
Желудочно-кишечный тракт	Ток крови, перистальтика, экзокринная секреция, антимикробное действие	Гастриты, язвы желудка, колиты, дискинезии моторики
Иммунная система	Антимикробное и антираковое действие	Воспаление, септический, эндотоксический, геморрагический шок, повреждение тканей, ускорение роста опухоли, васкуляризация тканей

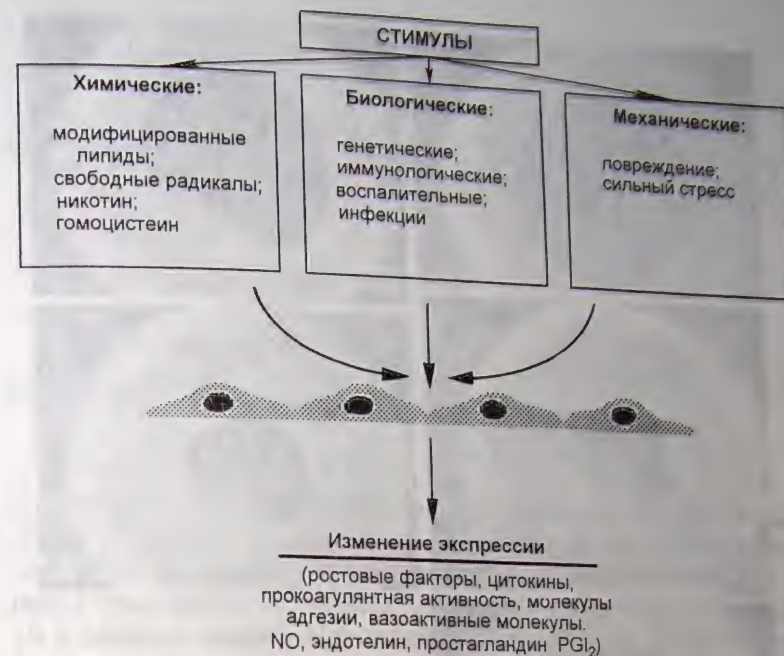


Рис. 10.8. Центральная роль сосудистого эндотелия в регуляции функции сосудистой стенки.

Необходимо отметить, что способность сосудистого эндотелия запускать вазорелаксацию уменьшается при дисфункции эндотелия, которая может возникнуть в ответ на различные стимулы: химические, биологические и механические (рис. 10.8). При этом происходит изменение экспрессии эндотелием ростовых факторов, цитокинов, изменяется прокоагулянтная активность, выработка молекул адгезии, сосудисто-активных веществ, в том числе и NO. Молекулярные события, сопровождающие дисфункцию эндотелия, могут быть причиной диабета, атеросклероза, гиперхолестеринемии и сердечной недостаточности. В этих случаях в практической медицине используют NO-доноры — лекарственные средства, которые высвобождают NO (нитроглицерин, изосорбид, динитрат, а также нодовые вазодилататоры, которые высвобождают NO со скоростью, близкой к физиологической: SNAP, DETA NONO-ate). На рис. 10.9 показано действие нитроглицерина на поврежденный атеросклерозом сосуд. При возникновении спазма в поврежденном сосуде уменьшается ток крови к сердцу и возникает резкая боль в груди. Нитроглицерин вызывает расширение артерий и ток крови восстанавливается.

Чрезмерный избыток NO трансформирует эффект этой сигнальной молекулы из цитостатического в цитотоксический.

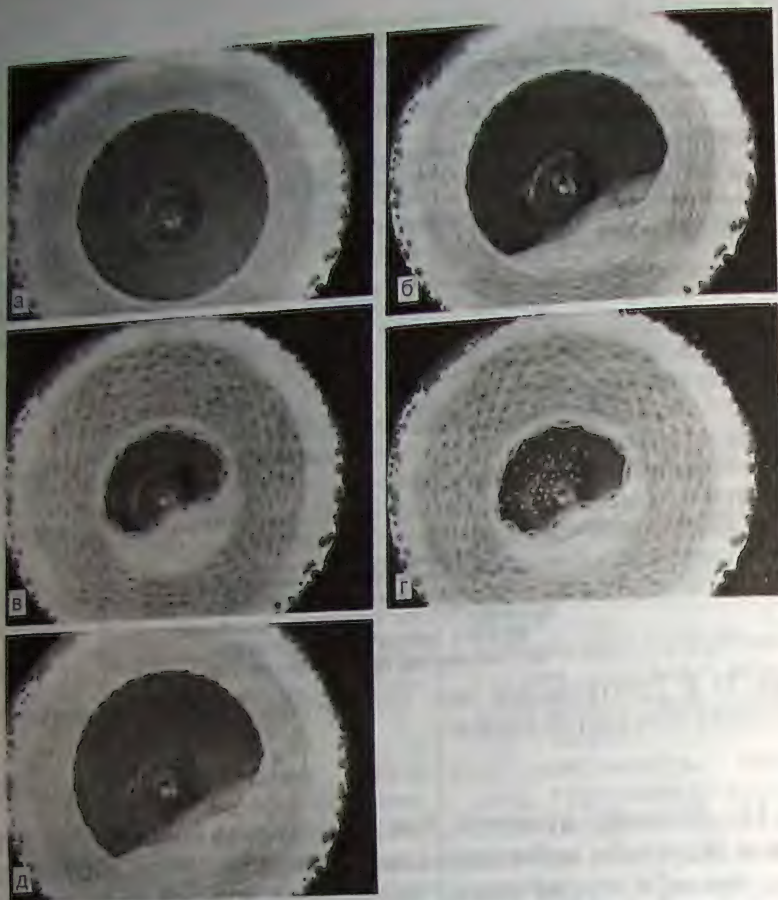


Рис. 10.9. Действие NO на поврежденный сосуд.

а — поперечный срез коронарной артерии сердца. Большая часть стенки заполнена гладкомышечными клетками, которые могут сокращаться и расслабляться; б — на стенке коронарной артерии образовалась атеросклеротическая бляшка. Она состоит из холестерина, нитей фибрина и клеток, участвующих в воспалительном процессе; в — в поврежденном атеросклерозом сосуде внезапно происходит спазм. Это уменьшает ток крови к сердцу и вызывает резкую боль в груди; г, д — нитроглицерин высвобождает NO, который вызывает расширение артерий. Ток крови восстанавливается.

Это может быть причиной разного рода заболеваний или сопровождать течение болезней. За образование и длительное выделение большого количества NO ответственна индуцибельная форма синтазы NO iNOS. Экспрессия iNOS увеличивается в эндотелии, медиально-адвентициальном слое и гладких мышечных клетках сосудистой стенки под действием многих воспалительных стимулов, в том числе цитокинов и эндотоксинов, например при септическом шоке. В этом случае NO может проявлять токсическое действие и участвовать в разру-

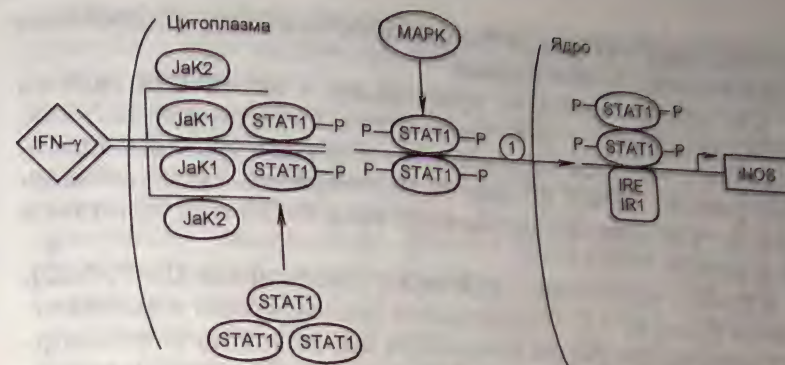


Рис. 10.10. Активация гена iNOS под действием IFN-γ.

шении ткани в ходе воспалительного процесса, дополняя действие липидных медиаторов и протеаз, активность макрофагов и нейтрофилов. Проявления токсических свойств NO в некоторых клетках, органах и системах суммированы в табл. 10.3 (правая графа). Цитотоксичность большого количества NO, как доказано, является следствием инициации апоптоза.

Септический шок — это самое драматическое проявление острых системных воспалительных реакций, при которых происходит индукция iNOS в кровеносных сосудах. Локальная индукция iNOS сопровождается также такие поражения сосудов, как дезэндотелизация и атеросклероз. Однако роль разных сосудистых клеток в индукции iNOS и гиперпродукции все еще неясна. Необходимо отметить, что воспалительные стимулы вызывают миграцию лейкоцитов к стенке сосуда. Таким образом, гиперпродукция NO в сосудах, возможно, обусловлена индукцией iNOS в нейтрофилах и макрофагах. Высокая концентрация NO при воспалении приводит к повреждению тканей. Условия, при которых NO меняет свои вазопротекторные свойства на токсические, могут зависеть не только от концентрации NO в ткани, но и от локальной концентрации тиолов, металлов переходной валентности, активных форм кислорода и, возможно, других соединений, реагирующих с NO. Доказано, что в гладкомышечных клетках сосудов аналогично макрофагам под действием бактериальных липополисахаридов и цитокинов увеличиваются синтез iNOS и продукция NO.

Индукция iNOS — это в высокой степени регулируемый процесс. iNOS активируется интерлейкином-1 (ИЛ-1), интерфероном γ (IFN-γ), фактором некроза опухолей (ФНО-α); ингибируется ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-10, инсулиноподобным ростовым фактором (IGF-1) и некоторыми другими цитокинами, а так-

же модулируется рядом сигнальных механизмов, особенно циклическими нуклеотидами.

Сигнальные каскады, приводящие к активации синтеза iNOS, специфичны для каждой клетки, но включают сигнальные пути с участием тирозинкиназ и общего транскрипционного фактора NF- κ B. На рис. 10.10 изображена схема сигнального пути активации промотора гена iNOS под действием интерферона IFN- γ .

В трансдукции сигнала участвуют Janus киназы (Jak1, Jak2), а также белки STAT — сигнальные трансдукторы и активаторы транскрипции (signal transducers and activators of transcription). После взаимодействия IFN- γ с тирозинкиназным рецептором гладкомышечной клетки сосудистой стенки активируются Jak-киназы, происходит транслокация STAT-белка к рецептору и после фосфорилирования STAT-белок уже в виде димерной молекулы проникает в ядро, взаимодействует со специфическими регуляторными элементами в ДНК и активирует транскрипцию гена iNOS. Jak/STAT-сигнальный путь может активироваться с помощью MAPK-киназы (mitogen-activated protein kinase) — участника других сигнальных путей. В результате конвергенции внутриклеточных сигнальных путей механизмы индукции iNOS могут несколько различаться в разных тканях и под действием разных стимулов. В среднем стойкую экспрессию iNOS можно наблюдать не менее 10 сут.

Гиперпродукция NO в сосудистой стенке вследствие резкого падения сосудистого сопротивления вызывает потенциально летальную гипотензию. Это происходит при септическом шоке и множественных органических поражениях у человека и может привести к сосудистому коллапсу. Артериальное давление и сосудистое сопротивление в таких случаях можно восстановить введением структурных аналогов аргинина, например N^G-монометиларгинина (L-NMMA) — конкурентного ингибитора iNOS.

Как клетки защищают себя от высокой продукции NO? Существует предположение, что увеличивается взаимодействие NO с супероксидным анион-радикалом. Показано, что NO активирует редокс-чувствительные регуляторные белки, в том числе и в митохондриях, изменения в которых могут привести к апоптозу.

Баланс между клеточной гибелью через апоптоз и размножением клеток, вероятно, важен не только при поражении сосудов, но также и при развитии долговременных изменений в их структуре под влиянием вазоконстрикторов и вазодилаторов и при гипертензии. Вызывая апоптоз и ингибируя пролиферацию сосудистой гладкой мышцы, NO может играть большую роль в ремодулировании сосудов.

При онкологических заболеваниях NO выполняет разнообразные и в ряде случаев противоречивые функции. Опубликованные в последние годы данные показывают, что свободные радикалы, в том числе NO и его производные, являются ключевыми факторами канцерогенеза. С одной стороны, NO принимает участие в этиологических механизмах, а также способствует злокачественному росту. Например, показано, что при хронических воспалениях органов NO может выступать как промотор рака. С другой стороны, NO, синтезированный лейкоцитами, оказывает большое влияние на их способность уничтожать раковые клетки. Разнообразна роль NO при лечении онкологических заболеваний. In vitro NO повышает цитотоксическое действие ряда химиотерапевтических агентов и радиоактивного облучения, однако доноры NO способны обеспечить защиту всего организма от тех же самых факторов. Вероятно, двойственная роль NO в отношении злокачественных клеток определяется тем, на какой стадии развития опухоли действуют NO и его производные, а также зависит от количества синтезированного NO.

Участие NO в цитотоксической активности макрофагов по отношению к опухолевым клеткам — одно из первых функциональных свойств, описанных для этой молекулы. Ингибирование синтеза NO в макрофагах снижает противоопухолевую сопротивляемость организма. Установление этого факта внесло огромный вклад в расширение исследований, связанных с функцией и регуляцией NO в норме и патологии. Более поздние исследования показали, что значительные количества NO, синтезируемые iNOS, экспрессируемой и в других типах клеток (например, в купферовских клетках, клетках-киллерах, микроглиальных и эндотелиальных клетках), оказывают цитотоксическое действие на многие типы опухолей.

Данные, полученные in vivo, предполагают важную роль NO в регуляции роста опухолей. Макрофаги, выделенные от животных, имеющих опухоли, проявляют пониженную способность продуцировать NO, а также ослабленную противоопухолевую активность. В какой-то мере снижение уровня экспрессии или активности iNOS частично может быть обусловлено синтезом супрессорных агентов в опухолях, например интерлейкина-10 (ИЛ-10), фактора роста опухолей β 1 (TGF- β 1) и простагландина E₂ (PGE₂), которые ослабляют как образование NO, так и цитотоксическую противоопухолевую активность макрофагов. У онкологических больных повышен уровень ИЛ-10 и TGF- β 1, что подтверждает наличие взаимосвязи между супрессивными факторами, снижением образования NO и размером опухоли. Взаимозависимость снижения уровня NO и увеличения размера опухолей указывает на то, что этот

свободный радикал является интегральной частью противоопухолевой защиты иммунной системы.

Несмотря на то что NO представляет собой один из эффекторов цитотоксического и цитостатического действия иммунной системы на опухолевые клетки, было установлено, что NO может выступать в роли важного медиатора роста опухолей. В различных видах опухолей экспрессируются конститутивная и индуцибельная формы NOS. Это указывает на особую функцию NO на разных стадиях развития опухолей. Различные виды опухолей (молочной железы у людей, шейки матки; опухоли, поражающие ЦНС, и др.) характеризуются повышенным уровнем NOS.

Установлено, что NO стимулирует опухолевый рост путем регуляции процессов жизнедеятельности опухолей, например оказывает влияние на синтез простагландинов (PGE_2). NO способен сдвигать равновесие в метаболизме арахидоновой кислоты в сторону простагландинсинтазы, ингибируя образование продуктов липоксигеназы. В частности, при повышении уровня PGE_2 повышается проницаемость капилляров, что увеличивает приток питательных веществ к ткани опухоли и способствует ее быстрому росту. PGE_2 , кроме того, является опухолевым супрессорным фактором, подавляющим цитотоксическую активность макрофагов. Аналогичный эффект NO на рост опухолей продемонстрирован на мышах: им имплантировали клетки аденокаркомы человека, для которых характерна суперэкспрессия iNOS.

В ряде работ было установлено, что пролиферация Т-лимфоцитов значительно ингибируется NO, и этот эффект обуславливает негативную роль NO при онкологических заболеваниях. Применение ингибиторов NO также повышает активность клеток-киллеров, активируемых лимфокинами и блокирующих развитие опухолей. Эти данные свидетельствуют о том, что NO играет важную роль в пролиферации Т-лимфоцитов внутри опухоли и в соседних тканях. Таким образом, NO оказывает влияние на многочисленные факторы, которые как положительно, так и отрицательно влияют на развитие опухолей.

Использование ингибиторов NOS может ослабить развитие опухолей по причинам, связанным с повышением инфильтрации лейкоцитов, снижением проницаемости капилляров, повышением системной активности макрофагов за счет стимуляции уровня липоксигеназы и понижением концентрации простагландинов и активации пролиферации Т-лимфоцитов. В одном из исследований показано, что проницаемость тканей при лечении ИЛ-2 снижается с помощью ингибиторов

NOS, предотвращая нежелательные побочные эффекты, развивающиеся при использовании этого цитокина в качестве леопосредовать противоопухолевую цитотоксическую активность, однако действие NO *in vivo*, несомненно, более сложно и нуждается в серьезном изучении. Совокупность данных указывает на то, что NO обладает цитотоксическими и цитостатическими свойствами, тем не менее ингибирование синтеза NO на разных стадиях развития опухолей также может оказаться полезным.

10.6. ОКСИД АЗОТА — МОДУЛЯТОР АПОПТОЗА

Как показано в последнее время, NO — активный участник биохимических и молекулярных событий в клетке, в том числе и таких, как пролиферация, экспрессия генов, а также запрограммированная клеточная смерть — апоптоз. Молекула NO обладает уникальной способностью инициировать и блокировать апоптоз. В основе проявления двойственности — бивалентности эффектов NO на апоптоз может быть множество причин, среди которых и непростая редокс-химия этой молекулы, и влияние на свойства NO его окружения, и специфическое для клетки взаимодействие сигнальных путей, которые регулируют ее жизнеспособность.

Чтобы обсудить модулирующее влияние NO на взаимодействие клеточных деструктивных и защитных сигнальных путей, необходимо обратить внимание на общие в разных клетках конечные стадии апоптоза. В настоящее время не вызывает сомнения участие в апоптозе митохондрий, специфических протеаз — каспаз, а также регуляторов апоптоза — белков семейства Bcl-2 (проапоптотические представители — Bax и Bak; антиапоптотические — Bcl-2 и Bcl-x_L).

Семейство белков Bcl-2 влияет на функцию митохондрий следующим образом:

- регулирует ионный обмен через мегапоры (PTP-поры, permeability transition pores). PTP-поры — сложные комплексы белков, среди которых есть белки-переносчики, ферменты, белки межклеточного матрикса. Эти сложные по составу и еще недостаточно изученные комплексы соединяют внешнюю сторону внутренней мембраны и наружную мембрану митохондрий;
- изменяют конформацию проапоптотических белков — факторов (AIF и Araf-1), заякоренных в митохондриальную мембрану и способных вместе с цитохромом с активировать смертоносную каспазу-3;

- обладают антиоксидантными свойствами;
- разные представители семейства могут образовывать комплексы. Отношение Вах и Bcl-2 способствует либо выживанию клетки (избыток Bcl- x_L), либо ее гибели (избыток Вах). Белки семейства Bcl-2 могут фосфорилироваться, что означает их связь с протеинкиназами и сигнальными путями клетки.

Каспазы (caspase) — это группа цистеиновых протеаз. Они расщепляют по остаткам аспарагиновой кислоты некоторые ключевые белки, среди которых регуляторы клеточного цикла, белки ядерного скелета, белки, участвующие в сплайсинге РНК и репарации ДНК. Кроме этого, «смертоносное» действие каспазы-3 приводит к активации эндонуклеаз, что вызывает разрыв ДНК на олигонуклеосомные фрагменты, к образованию апоптотических телец и их дальнейшему фагоцитозу.

На жизнь и смерть клетки может влиять множество факторов. Это могут быть ослабление сигналов, поддерживающих жизнь, усиление сигналов смерти, появление или исчезновение факторов роста, цитокинов, возникновение или ослабление межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействий, а также вирусные инфекции.

Установлено, что многие из этих сигналов приводят к изменению продукции NO и взаимодействию его с другими активными формами кислорода. Основное количество АФК образуется в митохондриях. В последнее время обнаружено, что в результате изменений митохондриальных мегапор из митохондрий выходит цитохром *c*. Вместе с другими проапоптотическими белками он активирует каспазу-3 и таким образом инициирует апоптоз. Выход цитохрома *c* из митохондрий стимулирует проапоптотические белки Вах и Bcl-2.

Постоянно высокая экспрессия белка Bcl-2 защищает клетку от апоптоза при широком диапазоне стимулов. Это подтверждает, что белок Bcl-2 контролирует общие стадии разных сигнальных путей, регулирующих жизнеспособность клетки.

В некоторых клеточных системах индуцибельная форма NOS генерирует значительные количества NO, при этом запускается процесс клеточной смерти, имеющий типичные морфологические и биохимические черты апоптоза.

Установлено, что NO активирует апоптоз за счет аккумуляции в клетке белка p53 — супрессора раковых новообразований, а также за счет увеличения экспрессии белка Вах (рис. 10.11). Увеличение экспрессии белка Bcl-2, наоборот, защищает клетку от цитотоксичности NO. На рис. 10.11 показаны места влияния NO на жизнь и смерть клетки, а также возможные места ингибирования апоптоза, инициированного NO.

Двойственная роль NO в процессе апоптоза

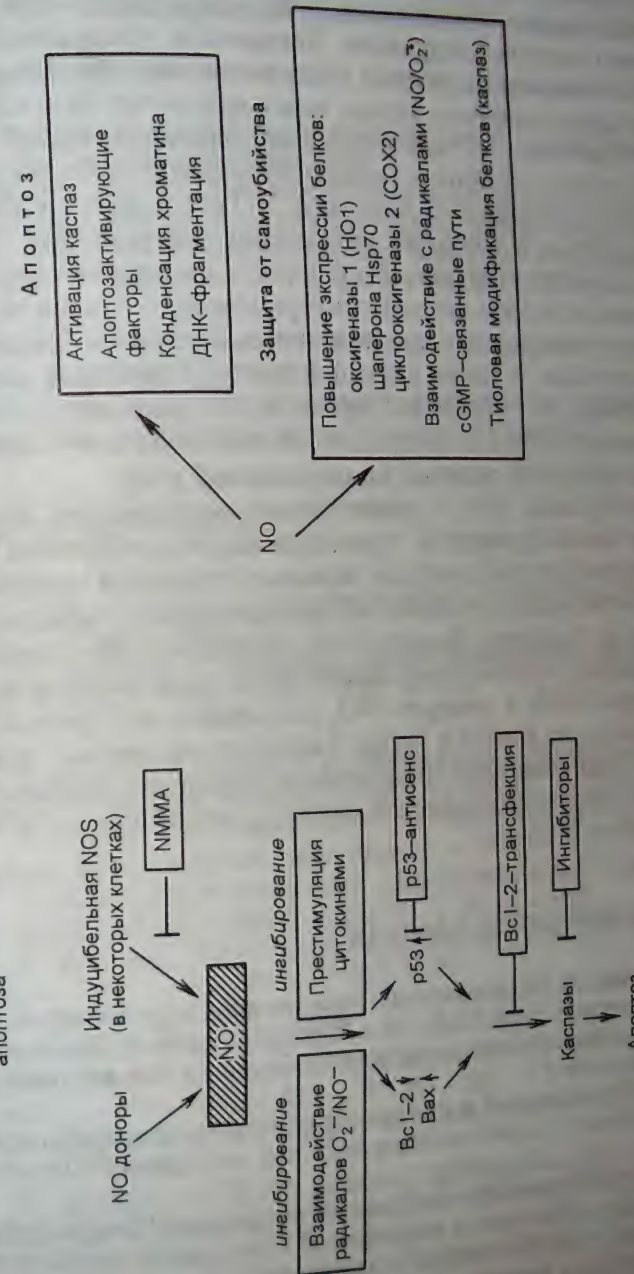


Рис. 10.11. Роль NO в апоптозе.

К важным фактором, определяющим баланс полезных и вредных эффектов NO, следует отнести количество NO, продолжительность его генерации и взаимодействие с окружающими молекулами. Проявлениями благоприятного действия NO можно считать следующее. Экспрессия продукции при NO можно считать следующее. Экспрессия продукции при остром воспалении на ранних стадиях сепсиса обеспечивает максимальную перфузию ткани, оказывая на нее тем самым защитное действие. NO предотвращает агрегацию тромбоцитов и тем самым тромбоз, а также нейтрализует действие токсичных форм кислорода. Кроме того, NO оказывает антимикробное действие и тормозит активацию нейтрофилов. При острых нарушениях функций органов и систем экспрессия iNOS может оказывать цитопротекторное влияние, так как NO стимулирует экспрессию двух защитных белков — Hsp-70 и циклооксигеназы, а также антиапоптотическое действие, ингибируя каспазы. NO проявляет, кроме этого, антиканцерогенную активность при его генерации воспалительными клетками в ходе иммунной реакции на опухолевый рост.

Таким образом, NO — удивительное вещество по своим физиологическим функциям, терапевтическое применение которого продолжает расширяться. Весьма обещающей представляется возможность регуляции NO биохимических процессов, в которых он участвует. Вместе с тем, поскольку NO — всеобщий медиатор метаболизма, необходимо вести поиск новых ингибиторов iNOS и доноров NO, способных избирательно воздействовать на клетки и ткани. Такие лекарственные вещества могут быть мощными средствами преодоления различных нарушений сердечно-сосудистой системы, метаболизма печени, кишечника и почек.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ

1. Известны две монооксигеназы млекопитающих, у которых кофакторами являются как FAD, так и FMN. Назовите их. Какие еще кофакторы и простетические группы необходимы для активности этих монооксигеназ?

2. Из каких соединений в клетках образуется двухатомный оксид азота? Какой еще продукт синтезируется под действием NO-синтазы?

3. Оксид азота синтезируется только в макрофагах? Какую функцию выполняет оксид азота в макрофагах? Какие вещества усиливают экспрессию гена NO-синтазы макрофагов?

4. Каково время жизни оксида азота? В какие соединения он превращается?

5. Какую роль выполняют редуктазный и оксигеназный домены NO-синтазы? Для чего нужен участок, расположенный между этими доменами?

6. Какие формы NO-синтазы поддерживают низкий стационарный уровень оксида азота, который не превышает нескольких микромольей? Для проявления каких функций необходимо такое количество оксида азота?

7. Что является важным различием между изоформами NO-синтазы?

8. Что отличает оксид азота от других сигнальных молекул? В чем его необычность?

9. С чем в клетках взаимодействует оксид азота? Что является результатом этих взаимодействий?

10. Что является основной белковой мишенью для оксида азота? Какие выделяют пути проведения сигнала оксида азота в клетках?

11. Как изменяется концентрация ионов Ca^{2+} в гладкомышечных клетках под влиянием оксида азота? Как это изменение влияет на мышечное сокращение?

12. В каких направлениях в медицине используются лекарственные средства — NO-доноры?

13. В каких случаях применяют лекарственные средства — специфические ингибиторы индуцибельной NO-синтазы?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Оксид азота в биологии: Сборник статей. Биохимия. — М., 1998. — Т. 63. — Вып. 7.
2. Снайдер С.Х., Бредт Д.С. Биологическая роль окиси азота//В мире науки. — 1992. — № 7. — С. 16—24.
3. Bredt D.S., Snyder S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule//Ann. Rev. Biochem. — 1994. — Vol. 63. — P. 175.
4. Griffith O.W., Stuehr D.J. Nitric oxide synthases — properties and catalytic mechanism//Ann. Rev. Physiol. — 1995. — Vol. 57. — P. 707.
5. Marletta M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis//Cell. — 1994. — Vol. 78. — P. 927—930.
6. Nathan C., Xie O. Nitric oxide synthase: roles, tolls, and controls//Cell. — 1994. — Vol. 78. — P. 915—918.
7. NO homepage in Internet: <http://www.apnet.com/no>.
8. Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor//Nature. — 1987. — Vol. 327. — P. 524—526.
9. Schmidt H.H.W., Walter U. NO at work//Cell. — 1994. — Vol. 78. — P. 919—925.
10. Stamler J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide//Cell. — 1994. — Vol. 78. — P. 931—936.

ОТВЕТЫ НА КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ

К главе 1

1. Определение активности ферментов: креатинкиназы (КК-МВ), АсАТ, АлАТ и ЛДГ (ЛДГ₁), в сыворотке крови.
2. А. Инфаркт миокарда.
Б. Креатинкиназы (общая активность и изофермента МВ).
3. Б. α -Амилаза.
Д. Панкреатической липазы.
4. Нарушение функции печени.
5. А. Определение активности простатического специфического антигена (ПСА) в сыворотке крови.
Б. Активность ПСА выше 4 мкг/л.
6. Б. Трипсин.
Г. Химотрипсин.
7. Это ингибиторы синтеза простагландинов (простагландинсинтазы).

К главе 2

1. С точки зрения целесообразности апоптоза в ходе эволюционного развития, этот процесс должен сформироваться с появлением многоклеточных организмов и межклеточной регуляции отдельных функций клеток.
2. Секретция гормонов эндокринными железами осуществляется за счет нейрогуморальной регуляции. Поэтому при повышенной концентрации кортизола в крови по механизму отрицательной связи происходят ингибирование синтеза рилизинг-факторов гипоталамуса (либеринов) и активация синтеза статинов, что уменьшает синтез адренокортикотропного гормона (АКТГ) гипофиза. АКТГ регулирует синтез кортизола клетками коры надпочечника, т.е. является фактором «выживания» для данных клеток. При его отсутствии наблюдается гибель секреторных клеток коры надпочечника путем апоптоза.
3. Белок Вах — индуктор апоптоза — входит в семейство белков Bcl-2. При поступлении апоптотического сигнала происходит гетеродимеризация белков — ингибиторов и индукторов апоптоза (Bcl-2/Вах) на наружной мембране митохондрий. Образование такого комплекса вызывает распад комплекса Bcl-2 — Araf-1 — неактивная протеаза и высвобождение в цитоплазму митохондриального содержимого, что запускает каскад апоптозоспецифических протеаз и реализацию апоптоза клетки. В случае мутации в гене, кодирующем белок Вах, формируется мутантный белок, сродство которого к Bcl-2 меньше. В результате происходит ингибирование апоптоза данных клеток и повышается вероятность онкотрансформации.
4. Белок p53, продукт одноименного гена, является одним из регуляторов экспрессии генов, продукты которых регулируют жизненный

цикл клетки. Его активация является ответом на повреждение ДНК. Если у больного обнаружена мутация гена p53, следовательно, белок не может выполнять свою функцию. Таким больным целесообразно назначать лучевую терапию, которая приводит к множественным повреждениям ДНК.

5. Фосфатидилсерин — фосфолипид, производное фосфатидной кислоты и аминокислоты серина. Данная молекула имеет отрицательный заряд. Транслокация фосфатидилсерина из внутреннего билипидного слоя плазматической мембраны в наружный формирует отрицательный заряд на поверхности плазматической мембраны. Возможно, данная перестройка необходима для изменения поверхностных свойств мембраны, что способствует фагоцитированию таких клеток макрофагами.
6. Вирусы, воздействуя на клетку, могут влиять на регуляцию апоптоза клетки-хозяина. Известны вирусы — ингибиторы и активаторы апоптоза. В связи с этим наблюдается либо повышенная выживаемость клеток, инфицированных вирусами (например, вирусами герпетической группы), либо повышенная гибель клеток, инфицированных вирусами (например, вирусом иммунодефицита человека).
7. Роль отдельных посредников в передаче сигналов можно изучать, моделируя (повышая или понижая) концентрацию каждого из предполагаемых участников развития апоптоза. Так, концентрацию кальция можно повысить, используя специфические ионофоры кальция (например, A23187), и уменьшать при помощи кальцийсвязывающих агентов (например, ЭДТА). Концентрацию cAMP можно повысить, используя липофильные аналоги cAMP (например, дибутирил-cAMP), а уменьшить при помощи активаторов фосфодиэстеразы. Увеличить или уменьшить концентрацию активных форм кислорода можно добавлением соответственно перекиси водорода или антиоксидантов.

К главе 3

1. Трансформированные клетки имеют специфические особенности:
 - 1) перестают подчиняться сигнальным системам организма и переходят на ауто- и паракринные механизмы регуляции;
 - 2) изменяют спектр белков и ферментов, среди которых появляются формы, стимулирующие рост, деление и обладающие чрезвычайно высоким сродством к энергетическим субстратам;
 - 3) синтезируют измененный набор адгезивных молекул, в результате чего теряет силу контактное торможение и стимулируется деление клетки;
 - 4) обнаруживают теломеразную активность, которая обеспечивает их бессмертие.
2. В сигаретном дыме содержатся ароматические углеводороды, которые в печени подвергаются действию ферментов детоксикации чужеродных веществ. Часть ароматических углеводородов может превращаться в канцерогены и, образуя ковалентные связи с азотистыми основаниями в молекуле ДНК, вызывать трансформацию клеток.

3. А. После оперативного вмешательства в организме могло остаться некоторое количество трансформированных клеток, которые в процессе опухолевой прогрессии и конкуренции клонов сформировали наиболее злокачественный фенотип. В плазматической мембране таких клеток снижена концентрация Е-кадгерина, катенинов и интегринов, происходит синтез гидролитических ферментов: коллагеназ, гепариназы, катепсина В, плазмина, которые, разрушая белки и протеогликаны межклеточного вещества и базальной мембраны, позволяют опухолевым клеткам проникнуть в кровеносное русло. Тромбоциты, фрагменты межклеточного матрикса, белковые миграционные факторы обеспечивают транспорт опухолевых клеток по крови и прикрепление к базальной мембране органов-мишеней, проникновение в ткань и формирование вторичной опухоли.

Б. Главным фактором, снижающим успешность применения противоопухолевых средств, является множественная лекарственная устойчивость (МЛУ). Как правило, МЛУ вторична, т.е. развивается под действием лекарственного препарата: вначале лечения наблюдается положительная динамика, но затем она исчезает в связи с увеличением способности клеток отторгать препарат. У клеток с МЛУ-фенотипом в плазматическую мембрану встроен Р-гликопротеин, который работает как АТР-зависимая помпа, выкачивающая препарат в межклеточную жидкость и таким образом снижающая его концентрацию внутри клетки до нетоксической.

4. Опухолевые клетки анеуплоидны, в них часто происходят транслокации. При ХМЛ опухолевая трансформация обусловлена реципрокной транслокацией *abl*-протоонкогена из хромосомы 9 в хромосому 22. Часть хромосомы 9, включая ген *abl*, отщепляется и присоединяется к хромосоме 22, а последняя в свою очередь отдает часть генетического материала хромосоме 9. Возникает аномальная хромосома 22 или филадельфийская хромосома, содержащая гибридный ген *c-abl-bcr*, который кодирует белок, обладающий высокой тирозинкиназной активностью. Филадельфийская хромосома сильно укорочена и легко идентифицируется под микроскопом.

5. Протоонкогены превращаются в онкогены в результате точковых мутаций, амплификации генов, хромосомных транслокаций, включения генетического материала вирусов, который содержит энхансерные и промоторные участки.

6. Белок Р53 — ядерный фосфопротеин, контролирующий транскрипцию ряда генов, которые участвуют в регуляции пролиферации и деления клеток, прохождении G₁/S проверочной точки. Клетки, имеющие повреждения в молекуле ДНК, задерживаются в фазе G₁ и Р53 стимулирует процесс репарации. Если клетка оказывается неспособной восстановить нативную структуру ДНК, то Р53 индуцирует апоптоз. Таким образом, белок Р53 действует как хранитель стабильности генома, или «молекулярный полицейский». Утрата функций Р53 происходит в результате мутаций в гене или при связывании его с различными вирусными белками, сопровождающемуся образованием неактивных олигомерных комплексов.

К главе 4

1. А, Б, Г.
2. А, Б, В.
3. А:З.

Б. Глутамат связывает NH₂ в реакции синтеза глутамина и увеличивает его выведение в виде аммонийных солей.

4. А. Аргининосукцинатлиазы.

Б. Цитруллина.

В. За счет аргинина увеличивается фонд орнитина и стимулируется синтез цитруллина.

5. А. Следует значительно снизить содержание фенилаланина в пище.

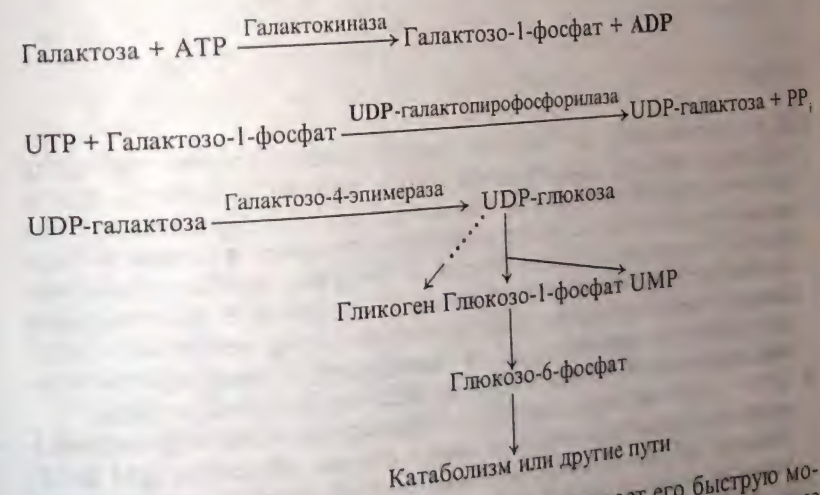
Б. 1.

6. Патологические симптомы возникли в результате нарушения пути реутилизации пуринов. В этих условиях ускоряется синтез пуринов *de novo* в результате повышения концентрации 5'-фосфорибозил-1'-дифосфата (PRDP).

К главе 5

1. Г. Приобретенный дефицит лактазы.

2. UDP-галактопирифосфорилаза обеспечивает метаболизм галактозы по следующему пути:



3. Разветвленное строение гликогена обеспечивает его быструю мобилизацию, так как гликогенфосфорилаза отщепляет концевые мономеры молекулы.

4. Метод количественного определения точек ветвления может быть основан на определении свободной глюкозы, образующейся при гидролизе α1—6 гликозидных связей.

5. В. UDP-глюкопирифосфорилаза.

6. Во втором случае.

К главе 6

1. У этих больных нарушен процесс β -окисления жирных кислот. Снижение утилизации жирных кислот — основного источника энергии при голодании приводит к повышенному использованию глюкозы, поэтому быстро развивается гипогликемия. Синтез кетоновых тел снижен, так как уменьшено образование ацетил-СоА — конечного продукта β -окисления жирных кислот и субстрата для биосинтеза жирных кислот.
2. А: 4; Б: 2.
3. Б.
4. А.
5. Д.
6. Д.
7. А: 4; Б: 1.
8. А, Г.
9. А, Б, Г, Д.
10. А, Б, Д.
11. А.

К главе 8

1. А, В, Д, Е.
2. А, Г, Д, Е.
3. А, Б, Г, Е.
4. Б, В, Д, Е.
5. А—Д.

К главе 9

1. IgA — основной класс антител, находящихся в секрете слизистых оболочек верхних дыхательных путей, пищеварительного тракта и мочеполовой системы. В слизистые секреты IgA попадает из крови транцитозом, имеет димерное строение, в состав димера входит секреторный компонент — белок, необходимый для транспорта IgA через эпителиальную клетку. IgA обеспечивают защиту поверхностей, контактирующих с детерминантами бактерий: антитела препятствуют их связыванию с поверхностью клеток слизистых оболочек и проникновению бактерий в ткани.
2. IgM — основной класс антител, секретируемых В-лимфоцитами в кровь на ранних стадиях иммунного ответа. Молекула IgM представляет собой пентамер, пять мономерных цепей которого соединены дисульфидными связями и дополнительной J-цепью. Каждый из 10 антигенсвязывающих участков обладает относительно низким сродством к антигенным детерминантам, но благодаря поливалентности молекул IgM они достаточно прочно связываются с чужеродными организмами, имеющими множество эпитопов, и поэтому легко вызывают их агглютинацию и лизис бактериальных клеток.
3. В молоке матери присутствуют IgA, которые, попадая в желудочно-

- но-кишечный тракт ребенка, препятствуют связыванию и проникновению бактериальной инфекции через слизистые оболочки.
4. IgG — единственный класс иммуноглобулинов, способный проходить через плаценту, так как на мембранах клеток плаценты имеются Fc-рецепторы к IgG. Эти иммуноглобулины чрезвычайно важны для защиты плода от бактериальной инфекции. В течение первых месяцев жизни у ребенка происходит разрушение полученных от матери IgG и одновременно начинается синтез собственных иммуноглобулинов. Вначале скорость синтеза иммуноглобулинов довольно низкая и в результате к 3-месячному возрасту концентрация иммуноглобулинов в крови ребенка достигает наименьших значений. Именно в этот период у некоторых детей могут развиваться тяжелые гнойные инфекционные заболевания.
 5. IgE синтезирует лишь небольшая часть плазматических клеток в ответ на попадание в организм чужеродных веществ. Концентрация IgE в крови невелика, так как они быстро связываются с Fc-рецепторами на поверхности тучных клеток и базофилов. При вторичном попадании того же антигена в организм он взаимодействует с антигенсвязывающими участками IgE на поверхности данных клеток, вызывает деформацию их клеточной мембраны и высвобождение биологически активных веществ: гистамина, серотонина, метаболитов арахидоновой кислоты, которые вызывают развитие острой местной или генерализованной воспалительной реакции (вплоть до анафилактического шока). Индивидуальные особенности синтеза IgE и пути попадания аллергена в организм определяют особенности проявления аллергических реакций (например, попадание аллергена через дыхательные пути может вызвать развитие бронхиальной астмы). В некоторых случаях увеличение выработки IgE к ограниченному числу специфических аллергенов может не изменять или даже уменьшать общую концентрацию IgE в крови.
 6. В составе вакцин содержатся лишенные патогенности или ослабленные микроорганизмы, которые сохраняют свойства нативных, но не способны вызвать серьезного заболевания. Первый контакт организма с этими антигенами приводит к развитию первичной иммунной реакции, в результате чего в организме появляются и длительное время циркулируют в крови клетки памяти. В случае вторичного контакта организма с этим же, но уже патогенным микроорганизмом развивается вторичный иммунный ответ, при котором клетки памяти быстро пролиферируют и обеспечивают быстрый и специфичный иммунный ответ.

К главе 10

1. NO-синтаза и цитохром P-450. Для активности этих монооксигеназ, кроме FAD и FMN, необходимы тетрагидробиоптерин, гем NADPH.
2. Атом азота в NO происходит из азота гуанидиновой группы аргинина, а кислородный атом — из атмосферного кислорода. Кроме оксида азота, образуется нитриллин.
3. В макрофагах впервые обнаружена индуцибельная форма NO-син-

тазы (iNOS), но она экспрессируется и во многих других клетках (печень, гладкомышечные клетки, миокард и др.). Кроме iNOS, существуют и другие формы NO-синтазы: конститутивные формы pNOS (в нервной системе) и eNOS (в сосудистой эндотелии). Индуцибельная NO-синтаза высвобождает большие количества оксида азота (сотни микромолей) под влиянием цитокинов, эндотоксина (сотни микромолей) под влиянием цитокинов, эндотоксического действия оксида азота.

4. Время жизни оксида азота составляет 6—8 с, после чего он превращается под влиянием кислорода и воды в нитраты и нитриты.
5. Редуктазный домен включен в транспорт электронов от NADPH на FAD и FMN, а в оксигеназном домене находится центр для связывания аргинина и активации кислорода. Между доменами расположен участок для связывания CaM, без которого любая форма NO-синтазы неактивна.
6. Конститутивные формы pNOS и eNOS поддерживают низкий стационарный уровень оксида азота, необходимый для нейротрансмиссии, поддержания электрической активности нервных клеток, вазорелаксации и других физиологических функций.
7. Индуцибельная форма NO-синтазы (iNOS) связана с CaM и активна при низких концентрациях Ca^{2+} , высвобождает большое количество NO, в результате чего усиливается апоптоз и проявляется цитотоксическое действие оксида азота. Связывание CaM с конститутивными формами (pNOS и eNOS) и соответственно активация происходит лишь при повышении концентрации Ca^{2+} . В результате высвобождается небольшое количество оксида азота (несколько микромолей) и проявляются физиологические эффекты.
8. Оксид азота — газ, свободно секретируется без участия переносчиков, быстро проникает в клетки, не связываясь с рецептором. Внутриклеточные эффекты радикала NO многообразны и зависят от количества, редокс-состояния оксида азота и окружающих молекул.
9. Оксид азота взаимодействует с молекулярным кислородом, металлами гемсодержащих и негемовых белков, а также с супероксидным анион-радикалом. В первых двух случаях происходят нитрозилирование и изменение активности металлсодержащих белков, а также белков, имеющих реактивные цистеины, — это физиологическое действие оксида азота. Образование пероксинитрита $ONOO^-$ после взаимодействия с O_2^- увеличивает количество активных форм кислорода, при этом усиливаются апоптоз, окисление белков и липидов. Из $ONOO^-$ может образовываться $ONO_2CO_2^-$, который вызывает химическую модификацию остатков тирозина в белках.
10. Гуанилатциклаза. В связи с этим выделяют cGMP-зависимый путь проведения сигнала и другие, которые не связаны с изменением количества cGMP в клетке.
11. Концентрация ионов Ca^{2+} в гладкомышечных клетках под действием оксида азота снижается, так как активируются АТФазы, уменьшается активность фосфолипазы C. В результате снижается активность протеинкиназы C. Киназа легких цепей миозина

переходит в дефосфорилированную форму, поэтому происходит мышечная релаксация.

12. При нарушениях сердечно-сосудистой системы для снижения давления и регуляции сосудистого тонуса: при сердечной недостаточности, гипертонии, стенокардии, атеросклерозе. Для уменьшения тромбообразования при тромбозах, для нейтрализации активных форм кислорода на ранних стадиях секса, а также для повышения эрекции при импотенции.
13. При септическом шоке, геморрагическом шоке, инфекционных болезнях; травмах, сопровождающихся бактериальными инфекциями, астме.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	4
Список сокращений	6
Глава 1. Клиническая энзимология. — <i>Н.В.Лихачева</i>	8
1.1. Строение ферментов и распределение их в клетках и тканях	9
1.1.1. Субклеточная локализация ферментов	9
1.1.2. Органная специфичность в распределении ферментов	11
1.2. Факторы, влияющие на уровень ферментов во внеклеточной жидкости	12
1.3. Основные направления использования ферментов в медицинской практике	14
1.3.1. Энзимодиагностика	14
1.3.1.1. Принцип диагностики заболеваний по активности ферментов в биологических жидкостях	14
1.3.1.2. Диагностика заболеваний	17
1.3.2. Использование ферментов в качестве лекарственных препаратов	24
1.3.3. Использование ингибиторов ферментов в качестве лекарственных препаратов	25
Контрольные вопросы и задачи	29
Список литературы	30
Глава 2. Апоптоз в патогенезе заболеваний. — <i>Н.Н.Белушкина, Е.Ю.Москалева, С.Е.Северин</i>	31
2.1. Апоптоз в иммунной системе	32
2.1.1. Механизм индукции апоптоза при связывании специфических рецепторов	32
2.1.2. Механизм индукции апоптоза при исключении ростовых факторов	34
2.2. Апоптоз и онкологические заболевания	37
2.2.1. Роль белка Bcl-2 в развитии опухолевых заболеваний	37
2.2.2. Механизмы индукции апоптоза при повреждении ДНК	39

2.3. Апоптоз и вирусная инфекция	41
2.3.1. Вирусы, инициирующие апоптоз клеток	41
2.3.2. Вирусы, ингибирующие апоптоз клеток	43
2.4. Нейродегенеративные процессы, нейроны коры головного мозга и апоптоз	44
2.5. Принципы коррекции апоптоза клетки	45
Контрольные вопросы и задачи	49
Список литературы	49

Глава 3. Молекулярные основы онкогенеза. — <i>С.А.Силаева</i> ..	51
3.1. Характеристика опухолевых клеток	52
3.2. Инвазия и метастазирование	55
3.3. Изменение метаболизма веществ в организме онкологических больных	56
3.4. Факторы, стимулирующие канцерогенез	57
3.5. Механизмы неопластической трансформации	61
3.6. Основные принципы диагностики и лечения рака	68
3.6.1. Опухолевые маркеры	68
3.6.2. Химиотерапия	70
Контрольные вопросы и задачи	73
Список литературы	73

Глава 4. Патохимия азотистого обмена. — <i>Л.В.Авдеева, Е.Г.Зезеров</i>	75
4.1. Метаболические нарушения цикла мочевины	75
4.2. Фенилкетонурия	81
4.3. Патохимия пуринового обмена	84
4.4. Роль ферментов обмена пуриновых нуклеотидов в функционировании Т- и В-лимфоцитов и в патогенезе иммунодефицитов	92
Контрольные вопросы и задачи	95
Список литературы	97

Глава 5. Биохимические основы патологии обмена углеводов. — <i>Т.Л.Алейникова</i>	98
5.1. Нарушение переваривания дисахаридов	98
5.2. Нарушение обмена фруктозы	103
5.3. Нарушение обмена галактозы	106
5.4. Гликогеновые болезни	111
Контрольные вопросы и задачи	120
Список литературы	120

Глава 6. Биохимические механизмы патологии обмена липидов. — <i>А.Е.Губарева, Е.Г.Зезеров</i>	122
6.1. Жирорастворимые витамины: функции, биохимические основы гиповитаминозов	124
	301

6.2. Желчнокаменная болезнь	126
6.3. Нарушения обмена жирных кислот	127
6.4. Ожирение печени	128
6.5. Ожирение	129
6.6. Дислиппротеинемии	134
6.7. Биохимические аспекты атеросклероза (этиология, патогенез, диагностика, профилактика, лечение)	139
Контрольные вопросы и задачи	151
Список литературы	154

Глава 7. Биохимия инсулинзависимого сахарного диабета. — А.Я.Николаев, Е.В.Осипов

155

7.1. Инсулин и глюкагон как регуляторы депонирования и мобилизации гликогена и жиров	156
7.2. Синтез и секреция инсулина	162
7.3. Глюкагон и глюкагоноподобные пептиды	167
7.4. Трансдукция инсулинового сигнала	170
7.5. Инсулинзависимый сахарный диабет — аутоиммунное заболевание	179
7.6. Нарушение синтеза гликогена и жиров при дефиците инсулина	186
7.7. Коматозные состояния (острые осложнения) при диабете как результат нарушения обмена глюкозы и жиров	187
7.8. Гликирование белков — одна из главных причин поздних осложнений сахарного диабета	189
7.9. Диабетические ангиопатии	191
7.10. Диагностика и лечение сахарного диабета	200
7.11. Перспективные методы лечения	202
7.12. Предсказание и предупреждение сахарного диабета	205
Контрольные вопросы и задачи	208
Список литературы	209

Глава 8. Алкоголизм. — Е.Г.Зезеров

211

8.1. Начальные стадии метаболизма эндогенного этанола в организме человека	211
8.2. Метаболизм ацетальдегида	215
8.3. Биологическое действие этанола	219
8.4. Острая алкогольная интоксикация	219
8.5. Хроническая алкогольная интоксикация	221
8.6. Алкогольная толерантность	224
8.7. Алкогольная зависимость	225
8.8. Синдром отмены	225
8.9. Лечение	226
8.10. Биохимические маркеры систематического употребления алкоголя	226
Контрольные вопросы и задачи	228
Список литературы	229

Глава 9. Введение в иммунологию и иммунопатологию. — Н.П.Волкова

231

9.1. Понятие о неспецифическом и специфическом иммунитете	231
9.2. Теория клональной селекции	235
9.3. Иммунологическая память	235
9.4. Антитела, или иммуноглобулины	238
9.5. Т-лимфоциты и клеточный иммунитет	246
9.5.1. Рецепторы Т-лимфоцитов	247
9.5.2. Белки комплекса МНС	247
9.5.3. Действие цитотоксических Т-лимфоцитов на клетки, зараженные вирусами	249
9.5.4. Т-хелперы: особенности функционирования и роль в иммунном ответе	250
9.6. Патология иммунной системы	253
9.6.1. Иммунодефициты	253
9.6.2. Реакции гиперчувствительности	256
9.6.3. Аутоиммунные болезни	260
Контрольные вопросы и задачи	264
Список литературы	265

Глава 10. Оксид азота как регулятор клеточных функций. — Н.Д.Воспелникова

266

10.1. Оксид азота: от открытия к клинике	266
10.2. Биосинтез оксида азота	267
10.3. Молекулярные основы действия оксида азота	272
10.4. Молекулярные мишени для оксида азота и пути проведения сигнала	274
10.5. Включение оксида азота в физиологические и патологические процессы органов и систем	277
10.6. Оксид азота — модулятор апоптоза	287
Контрольные вопросы и задачи	290
Список литературы	291
Ответы на контрольные вопросы и задачи	292

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Зав. редакцией *Т.П.Осокина*
Редактор издательства *М.Г.Фомина*
Художественный редактор *С.Л.Андреев*
Технический редактор *Н.А.Биркина*
Корректор *Т.Г.Ганина*

ЛР № 010215 от 29.04.97. Сдано в набор 13.09.2000.
Подписано к печати 31.10.2000. Формат бумаги
84×108 $\frac{1}{32}$. Бумага офсетная № 1. Гарнитура Таймс.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 15,96. Усл. кр.-отт.
15,96. Уч.-изд. л. 16,85. Тираж 1500 экз. Заказ № 3153.

Ордена Трудового Красного Знамени
издательство «Медицина».
101000, Москва, Петроверигский пер., 6/8.

Отпечатано в ОАО «Ярославский полиграфкомбинат»
150049, г. Ярославль, ул. Свободы, 97.

ISBN 5-225-04187-6



9 785225 041878